

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2003 年 12 月 31 日 (31.12.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/001041 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/09, C07K 16/42,  
19/00, C12N 1/21, C12P 21/02, C12N 9/90 // (C12N 1/21,  
C12R 1:19) (C12P 21/02, C12R 1:19)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/008020

(22) 国際出願日: 2003 年 6 月 25 日 (25.06.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2002-185020 2002 年 6 月 25 日 (25.06.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 積水化学工業株式会社 (SEKISUI CHEMICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒530-8565 大阪府 大阪市 北区西天満 2 丁目 4 番 4 号 Osaka (JP). 株式会社海洋バイオテクノロジー研究所 (MARINE BIOTECHNOLOGY INSTITUTE CO., LTD.) [JP/JP]; 〒026-0001 岩手県 釜石市 平田第 3 地割 7 5-1 Iwate (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 井手野 晃 (IDENO, Akira) [JP/JP]; 〒026-0001 岩手県 釜石市 平田第 3 地割 7 5-1 株式会社海洋バイオテクノロジー研究所内 Iwate (JP). 丸山 正 (MARUYAMA, Tadashi) [JP/JP]; 〒026-0001 岩手県 釜石市 平田第 3 地割 7 5-1 株式会社海洋バイオテクノロジー研究所内 Iwate (JP). 古谷 昌弘 (FURUTANI, Masahiro) [JP/JP];

〒618-8589 大阪府 三島郡 島本町百山 2-1 積水化学工業株式会社内 Osaka (JP).

(74) 代理人: 安富 康男 (YASUTOMI, Yasuo); 〒532-0011 大阪府 大阪市 淀川区西中島 5 丁目 4 番 2 0 号 中央ビル Osaka (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

— 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正書受領の際には再公開される。

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: EXPRESSION VECTOR, HOST, FUSED PROTEIN, PROCESS FOR PRODUCING FUSED PROTEIN AND PROCESS FOR PRODUCING PROTEIN

(54) 発明の名称: 発現ベクター、宿主、融合タンパク質、融合タンパク質の製造方法及びタンパク質の製造方法

(57) Abstract: It is intended to provide an expression vector, a host, a fused protein, a protein, a process for producing a fused protein and a process for producing a protein which prevent the formation of an inert and abnormal protein in producing a recombinant protein and thus make it possible to efficiently produce a target protein in the natural type (i.e., a soluble type) in a large amount. Namely, an expression vector containing (a) a first coding region encoding a polypeptide having a molecular chaperon activity and at least one restriction enzyme site into which (b) a second coding region encoding a protein can be inserted. In the above expression vector, the first coding region is effectively linked to a promoter and the restriction enzyme site is located within the same reading frame as the first coding region and in the downstream of the first coding region. Alternatively, the restriction enzyme site is located so that the second coding region having been inserted is effectively linked to a promoter and the first coding region is located within the same reading frame as the second coding region and in the downstream of the second coding region.

(57) 要約: 本発明の目的は、組み換えタンパク質生産時の不活性な異常型タンパク質の形成を防ぎ、目的タンパク質を天然型、即ち、可溶型として大量且つ効率的に生産させることを可能とする、発現ベクター、宿主、融合タンパク質、タンパク質、融合タンパク質の製造方法及びタンパク質の製造方法を提供することである。即ち、本発明は、(a) 分子シャペロン活性を有するポリペプチドをコードする第 1 コード領域、及び、(b) タンパク質をコードする第 2 コード領域を挿入することができる少なくとも 1 つの制限酵素サイトを有する領域を含有する発現ベクターである。本発明の発現ベクターにおいては、上記第 1 コード領域は、プロモーターに有効に連結しており、かつ、上記制限酵素サイトは、第 1 コード領域と同じ読断枠内であって、上記第 1 コード領域の下流にあるか、又は、上記制限酵素サイトは、挿入された上記第 2 コード領域がプロモーターに有効に連結するように配置されており、かつ、上記第 1 コード領域は、上記第 2 コード領域と同じ読断枠内にあって、上記第 2 コード領域の下流にある。

## 明細書

発現ベクター、宿主、融合タンパク質、融合タンパク質の製造方法及びタンパク質の製造方法

## 5 技術分野

本発明は、組み換えタンパク質が封入体等の異常型として発現することを防ぎ、天然型として可溶画分に生産することができる、発現ベクター、宿主、融合タンパク質、タンパク質、融合タンパク質の製造方法及びタンパク質の製造方法に関する。

10

## 背景技術

近年、種々の生物のゲノム解析が終了しつつあり、今後は遺伝子の発現産物であるタンパク質の網羅的な機能解析へと進むと考えられている。個々のタンパク質の性質を明らかにするとともに、タンパク質同士の相互作用を網羅的に解析することで、生命現象解明の一助としようとする研究が急速に増えつつある。一方、  
15 各種の生理活性物質と特異的に結合し、その作用を伝達する細胞内受容体タンパク質も、その受容体タンパク質と結合する活性物質が、新規医薬品の候補物質となり得ることから、その3次元構造決定に重大な関心が持たれ、新規医薬品のスクリーニングにおいて注目されている。このようなタンパク質の性質を決定し  
20 うとする場合、該当する遺伝子をベクター遺伝子上に組み込み、バクテリア、酵母、昆虫細胞等の宿主にトランスフォーメーションし、発現させて得られる組み換えタンパク質の性質を調べる方法が一般的である。

タンパク質の正しい性質を評価する際、そのタンパク質が、正しい立体構造に折り畳まれているか否かが非常に重要となる。しかしながら、異種生物由来のタンパク質を、上述の宿主発現系を用いたタンパク質発現法で作成しようとする場合、しばしばタンパク質のフォールディング異常により、立体構造の異なった異常型タンパク質しか得られないケースに遭遇する。このようなタンパク質は宿主  
25 内で封入体と呼ばれる凝集体として発現したり、宿主細胞のプロテアーゼにより、分解されたりすることが知られている。これらを解決するためには、目的タンパ

ク質の宿主細胞内での折り畳み反応が正確に行われるよう制御することが極めて重要であると考えられる。

目的タンパク質が異常型タンパク質である封入体として発現した場合、その正常型を得る手段としては、従来それをインビトロで正常型に変換する方法が一般的であった。即ち、宿主から封入体を回収し、高濃度の塩酸グアニジンや尿素等で可溶化後、適当な緩衝液等で30～100倍程度に希釈することで、可溶化した目的タンパク質をリフォールディングさせる方法である。一例を挙げると、抗体は、医療分野等での利用が期待されているが、その組み換え体が大腸菌を宿主としてその細胞質内に発現しようとする、ほとんどが不溶性の封入体として発現されることが知られている (Pluckthun、Biotechnology、9、545-、1991年)。封入体として得られた抗体を、効率よくインビトロでリフォールディングする方法として、希釈緩衝液中にタンパク質の折り畳みを促進するシャペロニンを含むことで、その収量を増大させる方法が提案されている (特開平9-220092号)。抗体以外にも、封入体タンパク質として発現するNGF/BDNFファミリータンパク質のリフォールディング方法 (特開平6-327489号、特開平6-319549号) や、ニューロトロフィン-3のリフォールディング方法 (特開平9-262093号) 等、希釈液中に還元剤、有機酸等を加えることで、目的タンパク質の収量を増大させる、さまざまな工夫が提案されてきた。しかしながら、封入体として得られたタンパク質をインビトロでリフォールディングさせるこれらの方法は、非常に手間がかかる割には、得られる収量は低い。

抗体の場合、そのN末端にシグナル配列を付与してペリプラズム領域に発現させれば、大腸菌を宿主として用いても可溶画分に発現できることが報告されている (Glockshuber、Biochemistry 31、1279-、1992年)。しかしながら、ペリプラズム領域は細胞質領域と比較して、非常に狭い領域であるため、タンパク質が発現される量も非常に少なく、たとえ、発現量が増やせたとしても、封入体となってしまう。細胞質内に抗体を可溶体として発現させようとする試みもいくつか報告されている。タンパク質のフォールディングに関与する分子シャペロンと抗体遺伝子を細胞質内で共発現させることで、

組み換え抗体の封入体形成を防ぎ、可溶型の収量を増大させる工夫や、宿主大腸菌としてチオレドキシン還元酵素欠損株を用いる方法等が提案されている（特開平9-220092号；P l o b a、G e n e 159、203-、1995年）。しかしながら、これらの方法は、可溶型の抗体を得ることができるとはいえ、  
5 その収量は1mg／培地1L程度と低く（L e v y、P r o t e i n E x p r e s s i o n a n d P u r i f i c a t i o n 23、338-、2001年）、更に生産効率の良い方法が必要とされている。

一方、膜タンパク質も生体膜の表面上又は内部に埋もれて存在する性質上、疎水性アミノ酸の含有率が高く、膜の非存在化で組み換えタンパク質として発現させた場合にはしばしば封入体として発現することが知られる。細胞に対する毒性を示す場合には発現にすら至らない場合が多い。膜タンパク質の組み換え型を取得する場合、酵母や動物細胞等の真核細胞を用い、その膜面分に発現させることが常套手段であるが、一方で発現量は少なく、また、培養発現する際にはコストと手間がかかるため、より簡便な発現方法が望まれている。

#### 発明の要約

本発明は、上記現状に鑑み、組み換えタンパク質生産時の不活性な異常型タンパク質の形成を防ぎ、目的タンパク質を天然型、即ち、可溶型として大量且つ効率的に生産させることを可能とする、発現ベクター、宿主、融合タンパク質、タンパク質、融合タンパク質の製造方法及びタンパク質の製造方法を提供することを目的とする。

即ち、本発明は、（a）分子シャペロン活性を有するポリペプチドをコードする第1コード領域、及び、（b）タンパク質をコードする第2コード領域を挿入することができる少なくとも1つの制限酵素サイトを有する領域を含有する発現ベクターである。

本発明の発現ベクターにおいては、上記第1コード領域は、プロモーターに有効に連結しており、かつ、上記制限酵素サイトは、第1コード領域と同じ読枠内であって、上記第1コード領域の下流にあるか、又は、上記制限酵素サイトは、挿入された上記第2コード領域がプロモーターに有効に連結するように配置され

ており、かつ、上記第1コード領域は、上記第2コード領域と同じ解読枠内にあって、上記第2コード領域の下流にある。

本発明の発現ベクターは、第1コード領域と、第2コード領域を挿入することができる少なくとも1つの制限酵素サイトを有する領域との間にあり、同じ解読  
5 枠内で翻訳されてプロテアーゼ消化サイトとなる領域を有することが好ましい。

本発明の発現ベクターは、タンパク質をコードする第2コード領域が組み込まれていることが好ましい。

本発明の発現ベクターにおいて、分子シャペロン活性を有するポリペプチドは、分子シャペロン活性を有するP P I a s eであることが好ましい。

10 上記分子シャペロン活性を有するP P I a s eとしては、FKBP型P P I a s e、シクロフィリン型P P I a s e、又は、パーブリン型P P I a s eが挙げられる。

上記FKBP型P P I a s eとしては、古細菌由来FKBP型P P I a s e、トリガーファクタータイプP P I a s e、F k p AタイプP P I a s e、又は、  
15 F K B P 5 2タイプP P I a s eが挙げられる。

上記シクロフィリン型P P I a s eとしては、C y P 4 0タイプP P I a s eが挙げられる。

上記パーブリン型P P I a s eとしては、S u r AタイプP P I a s eが挙げられる。

20 上記分子シャペロン活性を有するP P I a s eとしては、また、古細菌由来F K B P型P P I a s eのI Fドメイン、及び／又は、C末端ドメインを含有しているP P I a s e、トリガーファクタータイプP P I a s eのN末端ドメイン、及び／又は、C末端ドメインを含有しているP P I a s e、F k p AタイプP P I a s eのN末端ドメインを含有しているP P I a s e、F K B P 5 2タイプP  
25 P I a s eのC末端ドメインを含有しているP P I a s e、C y P 4 0タイプP P I a s eのC末端ドメインを含有しているP P I a s e、又は、S u r AタイプP P I a s eのN末端ドメインを含有しているP P I a s eが挙げられる。

本発明の発現ベクターにおいて、上記第2コード領域は、モノクローナル抗体をコードする塩基配列を有するか、又は、膜タンパク質をコードする塩基配列を

有することが好ましい。

本発明の発現ベクターを内包している宿主もまた、本発明の1つである。

本発明の宿主は、大腸菌であることが好ましい。

上記分子シャペロン活性を有するポリペプチド及び第2コード領域がコードするタンパク質を含有する融合タンパク質もまた、本発明の1つである。

本発明の融合タンパク質は、プロテアーゼ消化サイトを含有することが好ましい。

本発明の融合タンパク質を製造する方法もまた、本発明の1つである。

本発明の融合タンパク質の製造方法においては、本発明の発現ベクターを内包する宿主を、当該発現ベクターの発現条件下で培養し、上記融合タンパク質を細胞質に発現させるか、本発明の発現ベクターの第1コード領域の5'末端又は第2コード領域の5'末端に転写及び翻訳されてシグナル配列となる領域を設けて、得られた発現ベクターを内包する宿主を、当該発現ベクターの発現条件下で培養し、上記融合タンパク質をペリプラズム又は培地に発現させるか、又は、本発明の発現ベクターに、無細胞翻訳系において、上記融合タンパク質を発現させることが好ましい。

本発明の融合タンパク質の製造方法においては、P P I a s e 活性を阻害するマクロライド、シクロスポリン、ジユグロン、又は、これらの類縁化合物を担持した担体に、融合タンパク質を吸着させた後、上記担体を回収することが好ましい。

上記第2コード領域がコードするタンパク質を製造する方法であって、本発明の融合タンパク質の製造方法で得られた融合タンパク質をプロテアーゼ消化サイトを消化するプロテアーゼで消化するタンパク質の製造方法もまた、本発明の1つである。

#### 図面の簡単な説明

図1は、*Thermococcus* sp. KS-1由来ショートタイプFKBP型P P I a s e との融合タンパク質を作成するためのベクターT c F K f u s i o n 2 の遺伝子配置を示す図である。

図2は、TcFKfusion2を用いた場合のTcFKBP18の発現を示す図である。

図3は、宿主由来のタンパク質の電気泳動パターンを示す図である。

図4は、マウス由来antiニワトリリゾチーム(HEL)Fab抗体フラグメントとTcFKBP18との融合タンパク質の発現を示す図である。

図5は、マウス由来antiニワトリリゾチーム(HEL)Fab抗体フラグメントの単体での発現を示す図である。

図6は、マウス由来antiニワトリリゾチーム(HEL)scFvフラグメント及びそのTcFKBP18との融合タンパク質の発現を示す図である。

図7は、精製したマウス由来anti-HEL scFvとTcFKBP18との融合タンパク質と、それをトロンビン処理した結果を示す図である。

図8は、発現の結果得られたマウス由来anti-HEL scFvの活性をELISA法により示した図である。

## 15 発明の詳細な説明

以下に本発明を詳述する。

なお、本発明において、「プロモーターに有効に連結する」とは、分子シャペロン活性を有するポリペプチドが正常に転写されるように第1コード領域がプロモーターに連結していること、又は、目的タンパク質が正常に転写されるように第2コード領域がプロモーターに連結していることを意味する。

また、本発明において、「分子シャペロン活性を有するPPiase」には、実質的に同等の機能を有しているものも含まれる。即ち、実質的に同等のポリペプチド、少なくともこれらの一部分を含むポリペプチド、及び、一部のアミノ酸を他のアミノ酸に改変したもの等も含まれる。

更に、本発明において、「ドメイン」には、実質的に同等の機能を有するドメインも含まれる。

本発明の発現ベクターは、(a)分子シャペロン活性を有するポリペプチドをコードする第1コード領域を含有するものである。

上記分子シャペロン活性とは、変性したタンパク質を元の天然型にリフォール

ディングさせる活性、又は、変性したタンパク質の不可逆的な凝集を抑制する活性を意味する。例えば、ロダネーゼ、クエン酸合成酵素、リンゴ酸脱水素酵素、グルコース-6-リン酸脱水素酵素等をモデル酵素とし（河田、バイオサイエンスとインダストリー 56, 593-、1998年）、これらを6M塩酸グアニジン等のタンパク質変性剤で変性処理した後、検定対象物質を含む緩衝液で変性剤を希釈した際に開始する変性タンパク質の再生率や、変性タンパク質の凝集の抑制率でその検定対象物の分子シャペロン活性を評価することができる。なお、変性タンパク質の再生率を評価する方法としては、例えばロダネーゼの場合、ホロビッチらの方法（Horowitz, Methods Mol. Biol. 40, 361-、1995年）等が挙げられ、変性タンパク質の凝集抑制を評価する方法としては田口らの方法（Taguchi, J. Biol. Chem. 269, 8529-、1994年）等が挙げられる。

上記分子シャペロン活性を有するポリペプチドとしては特に限定されず、例えば、古細菌由来FKBP型PPIase等の分子シャペロン活性を有するPPIase；スモールヒートショックプロテイン、シャペロニン、プレフォルディン、DnaK、DnaJ、GrpE、HSP90等が挙げられる。

上記スモールヒートショックプロテインは、15～30kDa程度のサブユニットが、24～32個程度集まって巨大な分子構造をとり、シャペロン活性を有することが報告されている（Jakob, J. Biol. Chem. 268, 1517-、1993年）。これと相同性の高い領域をそのC末端領域に有するクリスタリンもまた、スモールヒートショックタンパク質と同様の性質を有しており、いずれも本発明の発現ベクターに適用可能である。

上記シャペロニンは7～9個のサブユニットが環状に連なったドーナツ型構造が2段に重なった、合計14～18個のサブユニットからなる特徴的な構造を有している。上記シャペロニンは、ドーナツ構造の凹部に変性タンパク質を捕捉し、ATP等のヌクレオチドの消費をともなってタンパク質のリフォールディングを促進する。真正細菌由来のグループ1型シャペロニンの場合は、更に補助因子としてGroES（ヒートショックプロテイン10）の結合を伴って、タンパク質の折り畳み反応を促進する。真核生物又は古細菌由来のグループ2型に属するシ



シャペロニンの場合は、GroESのような補助因子は必要とせず、効率的に正しい立体構造のタンパク質へと折り畳むことが知られている (Gupta, Mol. Microbiol. 15, 1-、1995年)。

上記プレフォルディンは真核生物のチューブリンのタンパク質折り畳みに関与する因子として見いだされた分子シャペロンであり (Lopez, J. Struct. Biol. 135, 219-、2001年)、6量体を形成し、インビトロでは、変性したタンパク質と相互作用するシャペロン活性を有することが知られている (Sieger, Cell 103, 621-、2000年)。

上記DnaK、DnaJ及びGrpEのホモログは生物種を問わず幅広く存在し、タンパク質のフォールディングに関与していると考えられている分子シャペロンである。これらのうち、特に大腸菌のDnaK/DnaJ/GrpE系のタンパク質フォールディングシステムはよく研究されている。これらの提案されている反応メカニズムとしては、リボゾームで生合成された新生ポリペプチドがDnaKと結合し、ATP存在下で更にDnaJが結合することで、不可逆的な凝集形成が抑制される。更にGrpEに依存したヌクレオチドの解離に伴い、新生ポリペプチドも解離され、シャペロニンのフォールディングシステムに受け渡されるというものである (Fink, Molecular chaperones in the life cycle of proteins, MARCEL DEKKER, INC, 1998)。本発明の発現ベクターにおいては、これら大腸菌由来のDnaK、DnaJ及びGrpEと同じ働するホモログを用いることができる。

上記HSP90 (ヒートショックプロテイン90) にも、シャペロン様活性を有するものがあり (Ramsey, J. Biol. Chem. 275, 17857-、2000年)、本発明の発現ベクターにおいては、そのホモログ、その一部又はそれらを含むポリペプチドを用いることができる。

上記分子シャペロン活性を有するPPIase (Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase) は、タンパク質のフォールディングに関与するタンパク質折り畳み因子の1つであり、細胞内でフォールディング途上のターゲットタンパク質中のアミノ酸のうち、プロリン残基のN末端側

ペプチド結合のシストランス異性化反応を触媒する活性（P P I a s e 活性）を有するものである。

上記分子シャペロン活性を有するポリペプチドとしては、なかでも、分子シャペロン活性を有する P P I a s e が好ましい。

- 5      上記分子シャペロン活性を有する P P I a s e はその阻害剤に対する感受性から、FK506 Binding Protein 型（FKBP 型）、シクロフィリン型及びパーブリン型の 3 種類に分類される。FKBP 型 P P I a s e は免疫阻害剤の 1 つである FK506 により活性が阻害される P P I a s e 及びそのホモログである。シクロフィリン型 P P I a s e は、別の免疫阻害剤であるシクロスポリンに対して感受性を持つ P P I a s e 又はそのホモログである。一方、パーブリン型 P P I a s e は、いずれの免疫阻害剤に対しても感受性を示さず、
- 10      ジュグロン（j u g l o n e）によりその活性が阻害される P P I a s e 又はそのホモログである。この 3 種類の P P I a s e は、アミノ酸一次配列上の相同性はほとんどない。

- 15      上記分子シャペロン活性を有する P P I a s e としては、上記の 3 種類の P P I a s e のうち、いずれのタイプの P P I a s e であつてもよい。

上記 FKBP 型 P P I a s e としては、例えば、古細菌由来 FKBP 型 P P I a s e、トリガーファクタータイプ P P I a s e（Huang、Protein Sci. 9、1254-、2000 年）、FkpA タイプ P P I a s e（Arie、Mol. Microbiol. 39、199-、2001 年）、FKBP 52 タイプ P P I a s e（Bose、Science 274、1715-、1996 年）等が挙げられる。

上記シクロフィリンタイプ P P I a s e としては、例えば、CyP40 タイプ P P I a s e（Pirkle、J. Mol. Biol. 308、795-、2001 年）等が挙げられる。

上記パーブリンタイプ P P I a s e としては、例えば、SurA タイプ P P I a s e（Behrens、EMBO J. 20、285-、2001 年）等が挙げられる。

上記古細菌由来 FKBP 型 P P I a s e の機能については、興味深いことに、

PP I a s e 活性だけでなく、タンパク質の不可逆的凝集を抑制すると同時に、変性タンパク質のリフォールディングを促進させる分子シャペロン活性を有することが見出されている (Furutani、Biochemistry 39、453-、2000年; Ideno、Eur. J. Biochem. 267、3139-、2000年; Ideno、Biochem. J. 357、465-、2001年; Ideno、Appl. Env. Microbiol. 68、464-、2002)。分子シャペロン活性は、本来、分子シャペロンの1つとして知られるシャペロニンやDnaK/DnaJ/GrpE系のタンパク質折り畳みシステムに見いだされた活性である。これらは、細胞内で生合成されたポリペプチドが正しい形に折り畳まれるよう、サポートする機能を果たしている。その際、ATP等の高エネルギー物質の加水分解を必要とする。上記古細菌由来FKBP型PP I a s eは、その分子シャペロン活性を発揮する際、上記高エネルギー物質の加水分解反応を必要としない点で優れている。

上記古細菌由来FKBP型PP I a s eは、その分子量の違いにより、2種類に大別できる。一方は分子量が16~18kDa程度のショートタイプであり、他方は26~33kDa程度のロングタイプである。本発明で用いられる古細菌由来FKBP型PP I a s eとしては、ショートタイプ、ロングタイプのいずれのFKBP型PP I a s eであってもよい。しかしながら、一般的に、ショートタイプの方がより強い分子シャペロン活性を有する傾向にあること、タンパク質の分子量が大きくなるにつれて、その組み換えタンパク質の発現量が低下する傾向があること、の2点を考慮すると、本発明ではショートタイプの古細菌由来FKBP型PP I a s eの方が好ましい。なお、上記した分子量の幅はこれまで見いだされているPP I a s eの分子量幅であり、本発明における古細菌由来FKBP型PP I a s eは、この分子量幅に限定されず、実質的に同じグループに属するものであればいずれであってもよい。

上記古細菌由来FKBP型PP I a s eとしては特に限定されず、いずれの古細菌由来のものであってもよく、例えば、これまで見いだされている古細菌由来FKBP型PP I a s eのうち、ショートタイプとしては、好熱性及び超好熱性菌由来古細菌であるMethanococcus thermolithotr

ophicus由来、Thermococcus sp. KS-1由来、Methanococcus jannaschii由来のもの、常温性古細菌である Methanosarcina mazei由来、Methanosarcina acetivorans由来、Methanosarcina barkeri由来のもの等が挙げられる (Maruyama, Front. Biosci 5、821-、2000)。一方、ロングタイプは、ゲノム解析やその他の解析の結果、ほとんどの古細菌のゲノム上で見いだされており、例えば、好熱性及び超好熱性古細菌である Pyrococcus horikoshii由来、Aeropyrum pernix由来、Sulfolobus solfataricus由来、Methanococcus jannaschii由来、Archaeoglobus fulgidus由来、Methanobacterium autotrophicum Thermoplasma acidophilum由来のもの、常温性好塩菌である Halobacterium cutirubrum由来のもの等が挙げられる (Maruyama, Front. Biosci 5、821-、2000年)。なかでも、常温性の古細菌由来のものが好ましい。上記ロングタイプの古細菌由来FKBP型PPIaseの1例として、Pyrococcus horikoshii由来のもののアミノ酸配列を配列番号1に、上記ショートタイプの古細菌由来FKBP型PPIaseの1例として、Methanococcus jannaschii由来のもののアミノ酸配列を配列番号2にそれぞれ示す。

上記古細菌FKBP型PPIaseは、PPIase活性とFK506との結合に関与するFKBPドメイン、及び、IFドメインを有しており、ロングタイプの古細菌FKBP型PPIaseの場合、更にC末端ドメインを有している (Maruyama and Furutani, Front Biosci. 1、D821-、2000年)。上記IFドメイン (Insert in the flap; Suzuki, J. Mol. Biol. 328, 1149-、2003年) は、アミノ酸一次配列上、FKBPドメインを構成するアミノ酸配列中に挿入された約100アミノ酸からなり、ドメイン構造を形成する特徴的な高次構造を形成している (Maruyama and Furutani, Fron

t Biosci. 1、D821ー、2000年；Insert in the flap；Suzuki, J. Mol. Biol. 328, 1149ー、2003年）。上記ショートタイプの古細菌FKBP型PPIaseの分子シャペロン活性には、FKBPドメインのFK506結合領域とIFドメインとが関与することがわかっている（Furutani、Biochemistry 39, 2822ー、2000年；Ideno、Biochem J 357、465ー、2001年）。また、上記ロングタイプの古細菌FKBP型PPIaseについては上記2つのドメインと共にC末端ドメインがその分子シャペロン活性に関与していることがわかっている（IDENO、Eur J Biochem. 267、3139ー、2000年）。本発明においては、古細菌由来FKBP型PPIaseのIFドメイン、及び／又は、C末端ドメインを含有しているPPIaseであれば、上記分子シャペロン活性を有するPPIaseとして用いることができる。例えば、本来分子シャペロン活性を持たないPPIaseであるヒトFKBP12にタンパク質工学的にIFドメインやC末端ドメインを導入したキメラPPIase等は上記分子シャペロン活性を有するPPIaseとして用いることができる。上記古細菌由来FKBP型PPIaseのIFドメインとしては、配列番号1では、78番プロリンから146チロシンまでの領域が、また、配列番号2では、78番プロリンから141番グルタミン酸までの領域がそれぞれIFドメインに相当する（IDENO、Eur J Biochem. 267、3139ー、2000年）。一方、上記古細菌由来FKBP型PPIaseのC末端ドメインとしては、配列番号1では、157番イソロイシンからC末端までの領域がC末端ドメインに相当する（IDENO、Eur J Biochem. 267、3139ー、2000年）。各ドメインの相同性はClustal W等の多重整列ソフトを用いることで判断することができる。

上記トリガーファクタータイプPPIaseはほとんどすべてのバクテリアのゲノム上で見つかっているPPIaseである。上記トリガーファクタータイプPPIaseとしては特に限定されず、例えば、大腸菌由来、Mycoplasma genitalium由来、Bacillus subtilis由来、Salmonella enterica由来、Staphylococcus

aureus由来、Mycobacterium leprae由来、Agrobacterium tumefaciens由来、Lactococcus lactis由来、Campyrobacter jejuni由来、Streptococcus pyogenes由来、Corynebacterium diphtheriae由来のもの等が挙げられる。また、本発明で用いられるトリガーファクタータイプPPaseは、アミノ酸配列においてバクテリア由来トリガーファクターと実質的に同じと認められるグループに属するものであれば、いずれのトリガーファクタータイプPPaseであってもよい。上記トリガーファクタータイプPPaseの一例として大腸菌由来のトリガーファクタータイプPPaseのアミノ酸配列を配列番号3に示し、塩基配列を配列番号4に示す。

上記トリガーファクタータイプPPaseは、PPase活性とFK506との結合に関与するFKBPドメインを中間ドメインとし、そのN末端側及びC末端側にそれぞれ2つのドメインを有している(Zarnit、J. Mol. Biol. 271, 827-837, 1997年)。上記トリガーファクタータイプPPaseの分子シャペロン活性は、古細菌由来FKBP型PPaseと同様にPPase活性とは独立した活性であることが知られ、そのN末端ドメイン及びC末端ドメインのいずれか一方、又は、両者の作用であることが示唆されている。本発明においては、トリガーファクタータイプPPaseのN末端ドメイン、及び/又は、C末端ドメインを含有しているPPaseであれば、上記分子シャペロン活性を有するPPaseとして用いることができる。上記トリガーファクタータイプPPaseのN末端ドメイン及びC末端ドメインとしては、配列番号3では、1番メチオニンから145番アルギニン付近の領域がN末端ドメインに相当し、252番フェニルアラニン付近からC末端までの領域がC末端ドメインに相当する(Zarnit、J. Mol. Biol. 271, 827-837, 1997年)。各ドメインの相同性はClustalW等の多重整列ソフトを用いることで判断することができる。

上記FkpAタイプPPase及びSurAタイプPPaseは、いずれも大腸菌をはじめとするグラム陰性バクテリアのペリプラズム領域に発現するP

P I a s eである。上記F k p AタイプP P I a s eはFK506により活性が阻害されるFKBP型P P I a s eであるのに対し、S u r AタイプP P I a s eは、FK506及び他の免疫抑制剤であるシクロスポリンのいずれの免疫抑制剤に対して感受性を示さない、パーブリン型P P I a s eホモログの1つである。

- 5 これら2つのP P I a s eもまた、分子シャペロン活性を示すタンパク質として知られている (R a m m, J. B i o l. C h e m. 275, 17106-、2000年; B e h r e n s, E M B O. J. 20, 285-、2001年)。

上記F k p AタイプP P I a s e及びS u r AタイプP P I a s eは、グラム陰性バクテリアのゲノムに見られるだけでなく、酵母等の真核生物のゲノムでも  
10 そのホモログが見つかってきている。

本発明で用いられるF k p AタイプP P I a s e及びS u r AタイプP P I a s eとしては特に限定されず、例えば、大腸菌由来、P y r o b a c u l u m a e r o p h i l i u m由来、P s e u d o m o n a s a e r u g i n o s a由来、X y l e l l a f a s t i d i o s a由来、N e i s s e r i a m e n i n g i t i d e s由来、M e s o r h i z o b i u m l o t i由来、H e a m o p h i l u s i n f l u e n z a e由来、R a l s t o n i a s o l a n a c e a r u m由来のもの等が挙げられる。また、バクテリア由来のものだけでなく、それらと同じグループに属し、実質的に同等の機能を有するものであれば、いずれの生物由来のP P I a s eであってもよい。上記F k p AタイプP  
15 P I a s eの一例として、大腸菌由来のもののアミノ酸配列を配列番号5に示し、塩基配列を配列番号6に示す。また、上記S u r AタイプP P I a s eの一例とし、大腸菌由来のもののアミノ酸配列を配列番号7に示し、塩基配列を配列番号8に示す。

上記F k p AタイプP P I a s eは、そのC末端側のFKBPドメインとそれ  
25 以外のN末端ドメインとを有している (A r i e, M o l. M i c r o b i o l. 39, 199-、2001年)。上記F k p AタイプP P I a s eの分子シャペロン活性もまたP P I a s e活性とは独立した活性であることが知られ、そのN末端ドメインの関与が示唆されている。本発明においては、F k p AタイプP P I a s eのN末端ドメインを含有しているP P I a s eであれば、上記分子シャ

ペロン活性を有するP P I a s eとして用いることができる。上記F k p AタイプP P I a s eのN末端ドメインとしては、配列番号5では、N末端から120番アスパラギン酸付近の領域がN末端ドメインに相当する(A r i e, M o l. M i c r o b i o l. 39, 1991, 2001年)。

- 5 一方、上記S u r AタイプP P I a s eもそのC末端側にパーブリン型P P I a s e間で相同性の高いドメインと、それ以外のN末端ドメインとを有している。

上記S u r AタイプP P I a s eの分子シャペロン活性にも、パーブリン型P P I a s e間で相同性の高いドメインとは別にN末端ドメインの関与が示唆されている(B e h r e n n s, E M B O J. 20, 2851, 2001年)。本  
10 発明においては、上記S u r AタイプP P I a s eのN末端ドメインを含有しているP P I a s eであれば、上記分子シャペロン活性を有するP P I a s eとして用いることができる。上記S u r AタイプP P I a s eのN末端ドメインとしては、配列番号7では、N末端から175番アスパラギン酸付近の領域がN末端ドメインに相当する。上記N末端ドメインの相同性はC l u s t a l W等の多重整  
15 列ソフトを用いることで判断することができる。

- 上記F K B P 52タイプP P I a s e及びC y P 40タイプP P I a s eは、いずれも真核生物中に見いだされるP P I a s eである。上記F K B P 52タイプP P I a s eは、約52 k D a程度のF K B P型P P I a s eで、p 59又はH S P 56等とも呼ばれる。そのアミノ酸配列は、ヒト由来12 k D a F K B  
20 P型P P I a s eと相同性の高い領域2つがタンデムに連なり、更にそのC末端側にカルモジュリン結合部位を含む領域が連なった構成を有する(R a t a j c z a t, J. B i o l. C h e m. 268, 131871, 1993)。上記C y P 40タイプP P I a s eは40 k D a程度の分子量を持ち、免疫抑制剤であるシクロスポリン感受性であるシクロフィリン型P P I a s eの1つである。  
25 いずれも、そのN末端にP P I a s e活性を担うドメインを、そのC末端にヒートショックタンパク質の1つであるH S P 90と結合するテトラトリコペプチドリピート(T P R)を含むドメインを有することを特徴とし、真核生物においてステロイドホルモンレセプター形成に関与するP P I a s eである(G a l a t, P e p t i d y l - P r o l y l c i s / t r a n s i s o m e r a s e



Oxford University Press 1998年)。上記FKBP 52タイプPPIase及びCyP40タイプPPIaseとしては特に限定されず、例えば、ヒト、マウス、ウシ、ウサギ、ラット等の真核生物由来のものが挙げられる。また、本発明で用いられるFKBP 52タイプPPIase及び

5 CyP40タイプPPIaseは、真核生物由来のものだけでなく、実質的に同等の機能を有するPPIaseと認められるグループに属するものであれば、いずれの生物由来のPPIaseであってもよい。

上記FKBP 52タイプPPIaseの一例として、ヒト由来のもののアミノ酸配列を配列番号9に示し、塩基配列を配列番号10に示す。また、上記CyP

10 40タイプPPIaseの一例として、ヒト由来のもののアミノ酸配列を配列番号11に示し、塩基配列を配列番号12に示す。

上記FKBP 52タイプPPIase及びCyP40タイプPPIaseの分子シャペロン活性には、TPRを含むそれぞれのC末端ドメインが関与していることが示唆されている。本発明においては、FKBP 52タイプPPIase及び

15 CyP40タイプPPIaseのC末端ドメインを含有しているPPIaseであれば、上記分子シャペロン活性を有するPPIaseとして用いることができる。上記C末端ドメインは、ヒトFKBP 52タイプPPIaseでは、配列番号9における264番グルタミン酸付近からC末端までの領域であるが、このうち264番グルタミン酸から400番イソロイシン付近の領域が特に重要であ

20 る。また、ヒトCyP40タイプPPIaseでは、184番ロイシン付近からC末端までの領域がC末端ドメインに相当する。

本発明で用いられる分子シャペロン活性を有するPPIaseとしては、上記例示のもの以外であっても、同等の分子シャペロン活性を有するPPIaseであれば、好適に用いることができ、そのようなものとしては、例えば、最近その

25 分子シャペロン活性が再評価されたブタ由来18kDaシクロフィリン型PPIase (Ou, Protein Sci. 10, 2346-、2001年) 等が挙げられる。

本発明の発現ベクターは、(b) タンパク質をコードする第2コード領域を挿入することができる少なくとも1つの制限酵素サイトを有する領域を含有するも

のである。

上記第2コード領域は、本発明の発現ベクターを用いて発現しようとする目的タンパク質をコードする塩基配列を有する領域である。

5 本発明で用いられる第2コード領域としては特に限定されないが、例えば、モノクローナル抗体等の抗体をコードする塩基配列や、膜タンパク質をコードする塩基配列を有するもの等が挙げられる。

上記抗体は、いずれの動物種由来の抗体であってもよく、抗体全長、その断片、F a b、S i n g l e c h a i n F v ( s c F v ) 等のその2個以上の断片がリンカーペプチドで連結したポリペプチド等も上記抗体に含まれる。また、上  
10 記抗体は、いずれのサブクラスであってもよい。

抗体は分子量が10万を越える巨大分子であり、特定の抗原物質に特異的に結合する機能を利用して、分析用試薬、生体外診断薬等として幅広く使用されており、産業的な利用価値が高い。抗体分子と抗原物質との結合に寄与している部分はV領域（可変領域）と呼ばれ、重鎖のV領域と軽鎖のV領域とから構成されて  
15 いる。特定抗原に対する抗体を取得する方法としては、ラットやウサギ等の実験動物に抗原物質を免疫感作させ、その血清に含まれる抗体（ポリクローナル抗体）を得る方法と、次に述べるモノクローナル抗体を得る方法とが一般的である。

モノクローナル抗体は、単一クローンの抗体産生細胞が産生する抗体であり、その特徴は一次構造が均一なことである。モノクローナル抗体はケーラーとミル  
20 シュタインによるハイブリドーマ技術の確立によって、容易に製造できるようになった。この方法では、まず、所定の抗原物質をマウス等の実験動物に投与し免疫感作を行う。次に、免疫感作された動物の脾臓から、上記抗原物質に対する抗体産生能を獲得した脾臓細胞を取り出し、これをミエローマのような適切な腫瘍細胞と融合させてハイブリドーマを作成する。ついでE L I S A の様な適当な免  
25 疫分析法を用いたスクリーニングにより、目的の抗体を産生しているハイブリドーマを選択する。その後、限界希釈法等を用いてクローニングすることにより、目的のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ株を樹立する。こうして樹立されたハイブリドーマを適当な培地中で培養した後、その代謝産物を含む培地をクロマトグラフ等を用いて分離することにより、目的のモノクローナル抗体が

得られる。しかしながら、これらの方法は、動物に対する免疫感作というインビボでの生体反応を利用しているため、必然的に実験動物の介在を必要とする。従って、実験動物を飼育維持しなければならず、煩雑な労力を必要とすると同時に、多大なコストが必要となる。また、この方法では必ずしも全ての抗原物質に対するモノクローナル抗体が製造できるとは限らず、試行錯誤的な要素が含まれる。

5 近年、大腸菌の表層に、抗体の重鎖及び軽鎖のV領域のみを適当なリンカーを介して連結させた s c F v 又は抗体の F a b 部分が発現できるようになってきた。これら抗体遺伝子を P C R でランダムに増幅することで抗体遺伝子のライブラリーを作成し、細胞外に提示させ、これらのライブラリーから特定抗原に親和性を有するものをスクリーニングする方法が開発されつつある（熊谷ら、タンパク質・核酸・酵素 43、1591、1998年）。スクリーニングによって得られた抗体遺伝子を実験動物を用いて発現すれば、目的の抗原に対する抗体を、実験動物を用いることなく作成することが可能である。しかしながら、例えば抗体遺伝子を実験動物内で大量発現させる場合、前述の通り、ほとんどが不溶性の封入体として発現され、活性型を得ることはできなかった。

10 15

これに対して、本発明の発現ベクターに第2コード領域としてモノクローナル抗体をコードする塩基配列を有するものを組み込めば、スクリーニングで得られた抗体の活性型（可溶型）産物を簡単に取得することが可能となる。

上記膜タンパク質としては特に限定されず、例えば、生理活性物質の受容体等が挙げられる。上記生理活性物質の受容体は、細胞外のさまざまな物質に選択的に応答し、細胞内に多彩なシグナルを伝達することから、その機能を解明することが創薬に直接繋がるとして非常に注目されている。これらの膜受容体タンパク質は構造的によく保存されたファミリーを形成しており、大きく分けて、イオンチャンネル内在型、チロシンカイネース型、及び、Gタンパク質共役型等の3つに

20 25

分類される。上記イオンチャンネル内在型は、リガンドが受容体に結合すると、受容体そのものに存在するイオンチャンネルが開き、 $\text{Na}^+$ や $\text{Ca}^{2+}$ 等を細胞内外のイオン勾配を利用して細胞内に移動させるタイプである。上記チロシンカイネース型は、リガンドの結合をリン酸化活性の上昇に転換させ、一連のカスケードを引き起こすことによりシグナルを増幅する。上記Gタンパク質共役型は、受容体

自身はイオンチャネルや酵素活性をもたず、リガンドの結合による情報をGタンパク質を介して細胞内に伝達する。膜受容体タンパク質を標的とした医薬品は数多く開発されているが、その多くがGタンパク質共役型受容体（GPCR）をターゲットとしている。したがって、GPCRの内因性リガンドを特定し、更にその機能及び構造を明らかにすることによって、迅速な医薬品開発が可能になることが期待できる。これらのリガンドスクリーニングや構造解析のための結晶化や重水素化のためにはGPCRの大量発現技術の開発が不可欠であるが、これまでGPCRの発現は大腸菌や酵母では不可能であるとされてきており、主にCHOやCOS-7、HEKのような動物培養細胞で発現した微量なサンプルを用いて様々な分析を行っているのが現状であった。

これに対して、本発明の発現ベクターに第2コード領域として膜タンパク質をコードする塩基配列を有するものを組み込めば、組み換え型タンパク質を安価に大量調整することができる。

上記制限酵素サイトはマルチクローニングサイトとも呼ばれる。上記制限酵素サイトを有する領域は、目的とするタンパク質をコードする遺伝子を第2コード領域として挿入する領域である。

本発明の発現ベクターにおいては、（1）上記第1コード領域がプロモーターに有効に連結しており、かつ、上記制限酵素サイトが第1コード領域と同じ読枠内であって、上記第1コード領域の下流にあるか、又は、（2）上記制限酵素サイトが挿入された上記第2コード領域がプロモーターに有効に連結するように配置されており、かつ、上記第1コード領域が上記第2コード領域と同じ読枠内にある。

上記プロモーターとしては特に限定されず、例えば、Placプロモーター、Ptacプロモーター、xy1Aプロモーター、AraBプロモーター、lambdaplacプロモーター、T7プロモーター、gal1/gal10プロモーター、nmt1プロモーター、ポリヘドリンプロモーター、マウスメタロチオネインプロモーター等が挙げられる。

本発明の発現ベクターでは、上記制限酵素サイトに目的とするタンパク質をコードする第2コード領域を挿入して、第2コード領域が組み込まれている発現ベ

クターを得、この発現ベクターを発現させることにより、（１）上記第１コード領域がプロモーターに有効に連結しており、かつ、上記制限酵素サイトが第１コード領域と同じ解読枠内であって、上記第１コード領域の下流にある場合は、第１コード領域とそれに続く第２コード領域が上記プロモーターにより翻訳され、  
5 一方、（２）上記制限酵素サイトが挿入された上記第２コード領域がプロモーターに有効に連結するように配置されており、かつ、上記第１コード領域が上記第２コード領域と同じ解読枠内にあって、上記第２コード領域の下流にある場合は、第２コード領域とそれに続く第１コード領域が上記プロモーターにより翻訳され、いずれの場合も、第２コード領域にコードされている目的タンパク質は分子シャ  
10 ペロン活性を有するポリペプチドとの融合タンパク質として発現される。

本発明の発現ベクターは、上記第１コード領域と上記第２コード領域を挿入することができる少なくとも１つの制限酵素サイトを有する領域との間にあり、同じ解読枠内で翻訳されてプロテアーゼ消化サイトとなる領域を有してもよい。

上記プロテアーゼ消化サイトは、本発明の発現ベクターに第２コード領域が組み込まれた発現ベクターの発現により得られる、第１コード領域にコードされる分子シャペロン活性を有するポリペプチドと第２コード領域にコードされるタンパク質とが結合した融合タンパク質において、上記ポリペプチドと上記タンパク質とをつなぐペプチドリinkerとなるものである。得られた融合タンパク質がプロテアーゼ消化サイトを有することにより、プロテアーゼを作用させることによ  
15 って容易に融合タンパク質を消化して、第１コード領域にコードされる分子シャペロン活性を有するポリペプチドと第２コード領域にコードされるタンパク質とを切り離して、目的とする第２コード領域にコードされるタンパク質を得ることができる。

上記プロテアーゼとしては特に限定されず、例えば、トロンビン、ファクター  
25 X a、プレシジョンプロテアーゼ等が挙げられる。これらのプロテアーゼはファルマシアバイオテク社等から市販されている。また、インティンの自己タンパク質スプライシング機能を利用して目的タンパク質を切り離すことも可能である。

上記プロテアーゼ消化サイトをコードする塩基配列の長さは特に限定されないが、１５～９０塩基程度であることが好ましく、翻訳されてグリシンやセリン等

の中性アミノ酸となる塩基配列を多く含むことが好ましい。

本発明の発現ベクターには他の公知の塩基配列が含まれていてもよい。上記他の公知の塩基配列としては特に限定されず、例えば、発現産物の安定性を付与する安定性リーダー配列、発現産物の分泌を付与するシグナル配列、ネオマイシン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子等の形質転換された宿主において表現型選択を付与することが可能なマーキング配列等が挙げられる。

本発明の発現ベクターは、得られる融合タンパク質が適当なりガンドを介して固定化担体に結合する形態に設計されていてもよい。これにより発現後、その精製を簡略化することができる。例えば、分子シャペロン活性を有するポリペプチドとして P P I a s e を用いる場合、F K B P 型 P P I a s e であれば F K 5 0 6 やラパマイシン、その類縁化合物を担持させた担体を、シクロフィリンタイプ P P I a s e であればシクロスポリン又はその類縁化合物を担持させた担体を、パーブリンタイプ P P I a s e であれば J u g l o n e 又はその類縁化合物を担持させた担体をそれぞれ用いることにより融合タンパク質の精製を簡略化することができる。

また、上記分子シャペロン活性を有するポリペプチドの N 末端側に、ヒスチジン 6 残基程度のタグを有するよう本発明の発現ベクターを設計すると、得られた融合タンパク質は、ニッケル等の金属をキレートした担体に、ヒスチジン残基を介して結合するので、当該担体を用いれば、宿主由来のタンパク質と融合タンパク質とを簡単に分離することができる。更に、上記担体に結合した融合タンパク質にプロテアーゼを作用させることにより、上記プロテアーゼ消化サイトが消化され、目的タンパク質のみを簡単に担体から遊離させることができる。

なお、イミダゾールで溶出すれば、プロテアーゼを作用させることなく、融合タンパク質のまま担体から遊離させることもできる。上記のヒスチジンタグ以外にも、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ又はその一部分をタグとし、グルタチオン樹脂によるアフィニティークロマトグラフィーにより精製する方法や、マルトース結合タンパク質又はその一部をタグとし、マルトース樹脂により精製する方法等を用いることもできる。その他、抗体との親和性を用いることもでき

る。上記の各種タグは、融合タンパク質のN端側及びC末端側のいずれに設計してもよく、双方に設計してもよい。これらの遺伝子操作方法や、アフィニティー精製方法としては、当業者に公知の方法を用いることができる。

5 本発明の発現ベクターに目的とするタンパク質をコードする遺伝子を第2コード領域として組み込んで発現させることにより、第1コード領域にコードされる分子シャペロン活性を有するポリペプチドと第2コード領域にコードされるタンパク質との融合タンパク質が得られる。このような上記分子シャペロン活性を有するポリペプチド及び第2コード領域がコードするタンパク質を含有する融合タンパク質もまた、本発明の1つである。更に、両者の間にプロテアーゼ消化サイトを含むリンカーペプチドが組み込まれている場合は、得られた融合タンパク質をプロテアーゼで消化すれば、目的タンパク質を容易に融合タンパク質から切り出すことができる。このため、本発明の融合タンパク質は、プロテアーゼ消化サイトを含有することが好ましい。

15 本発明の発現ベクターは宿主に導入されて目的タンパク質の発現に供される。このような本発明の発現ベクターを内包している宿主もまた、本発明の1つである。

上記宿主としては特に限定されず、例えば、細菌等の原核生物、酵母、真菌、植物、昆虫細胞、ほ乳類細胞等が挙げられる。しかしながら、使用される宿主と発現ベクターとの特性は適合しなければならない。例えば、ほ乳類細胞系において融合タンパク質を発現する場合、発現ベクターは、マウスメタロチオネインプロモーター等のほ乳類細胞のゲノムから単離されたプロモーターや、バキュロウイルスプロモーター、ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター等のほ乳類細胞で成長するウイルスから単離されたプロモーターを用いることが好ましい。

上記宿主としては、なかでも、大腸菌等の原核生物が好ましい。

25 本発明の発現ベクターを宿主に導入する方法としては特に限定されず、公知の種々の方法を用いることができ、例えば、トランスフェクションとしてリン酸カルシウム沈殿法、電気穿孔、リポソーム融合、核注入、ウイルス又はファージ感染等が挙げられる。

本発明の発現ベクターを適切な宿主に導入し、宿主を適切な条件下で培養し、

発現させることにより大量の融合タンパク質を得ることができる。このような、本発明の融合タンパク質を製造する方法もまた、本発明の1つである。

本発明の融合タンパク質の製造方法においては、本発明の発現ベクターを内包する宿主を、当該発現ベクターの発現条件下で培養し、上記融合タンパク質を細胞質に発現させるか、本発明の発現ベクターの第1コード領域の5'末端又は第2コード領域の5'末端に転写及び翻訳されてシグナル配列となる領域を設けて、得られた発現ベクターを内包する宿主を、当該発現ベクターの発現条件下で培養し、上記融合タンパク質をペリプラズム又は培地に発現させるか、又は、本発明の発現ベクターに、無細胞翻訳系において、上記融合タンパク質を発現させることが好ましい。

グラム陰性細菌を宿主として用いる場合、融合タンパク質の発現は、細胞質であっても、ペリプラズム又は培地への発現であっても良い。本発明の発現ベクターの第1コード領域の5'末端又は第2コード領域の5'末端に、転写及び翻訳されてシグナル配列となる領域を設けることにより、上記融合タンパク質をペリプラズム又は培地に分泌発現することができる。上記融合タンパク質をペリプラズムに発現させる場合、第1コード領域にコードされるポリペプチドとしては、本来細胞内では膜に存在するポリペプチドを用いると発現性を向上させることができる。上記本来細胞内では膜に存在するポリペプチドとしては、例えば、FKBPタイプPPaseであるFkpAタイプPPaseや、パーブリンタイプPPaseであるSurAタイプPPase等が挙げられる。これらのPPaseは本来グラム陰性菌のペリプラズムに存在し、タンパク質の折り畳みに関与するタンパク質である。

上記第2コード領域にコードされるタンパク質が膜タンパク質や抗体等である場合、本来これらのタンパク質は細胞質外に発現しているタンパク質であるため、上記FkpAタイプPPaseやSurAタイプPPase等と融合して発現させれば発現性が向上する。

本発明の発現ベクターに、無細胞翻訳系において、上記融合タンパク質を発現させる場合は、宿主細胞を用いることなく、バクテリア又は真核生物抽出液等を用いた無細胞翻訳系 (Spirin, A. S., 1991, Science 1



1, 2656-2664: Falcone, D. et al., 1991, Mol. Cell. Biol. 11, 2656-2664) にて、本発明の融合タンパク質を可溶性タンパク質として発現させる。

5 本発明の融合タンパク質の製造方法においては、PPIase活性を阻害するマクロライド、シクロスポリン、ジュグロン、又は、これらの類縁化合物を担持した担体に、融合タンパク質を吸着させた後、担体を回収することが好ましい。

10 上記分子シャペロン活性を有するPPIaseと上記の阻害剤との結合性は強く、この親和力を利用して発現した融合タンパク質を精製することができる。例えば、アガロースゲル担体上にFK506等のマクロライドを担持させたビーズを用いれば、FKBP型PPIaseとの融合タンパク質を特異的に結合させることができる。同様に、シクロフィリン型PPIaseとの融合タンパク質の場合はシクロスポリンを担持させた担体を、パーブリンタイプPPIaseとの融合タンパク質の場合はジュグロン(Juglone)を担持させた担体を用いれば精製を簡略化することができる。

15 本発明の融合タンパク質の製造方法で得られた融合タンパク質をプロテアーゼ消化サイトを消化するプロテアーゼで消化することにより目的タンパク質を得ることができる。このような、上記第2コード領域がコードするタンパク質を製造する方法もまた、本発明の1つである。

20 本発明によれば、目的のタンパク質を分子シャペロン活性を有するポリペプチドとともにペプチドリンカーで連結して、融合タンパク質として発現させることで、本来、異常型として発現される難発現性タンパク質を天然型の可溶体として大量に発現でき、その生産性を大幅に飛躍させることができる。また、目的タンパク質が抗体である場合、本発明によれば、実験動物を用いることなく簡便に機能を有した組み換え型抗体を調製することが可能となるので、他のタンパク質や  
25 ペプチド等と融合させることで、高機能な抗体を大量調製することが可能となる。

発明を実施するための最良の形態

以下に実施例を掲げて本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれら実施例のみに限定されるものではない。

(実施例1) 超好熱性古細菌 *Thermococcus* sp. KS-1 由来ショートタイプFKBP型PPIase (TcFKBP18) と融合するための発現ベクター構築

- 5 分子シャペロン活性を有するTcFKBP18 (Ideno、Biochem. J. 357、465-、2001年) の発現プラスミドpEFE1-3 (Iida、Gene 222、249-、1998) を鋳型とし、そのTcFKBP18 遺伝子断片をPCR法により増幅した。PCR用のプライマーとして、表1に示したTcFu-F1及びTcFu-R2を用いることにより増幅産物の両端に
- 10 制限酵素サイトを設けた。一方、TcFKBP18 融合タンパク質をプロテアーゼによりTcFKBP18 と目的タンパク質とに切断するためのリンカーをコードする塩基配列として、Throm-F2及びその相補鎖を設計した。Throm-F2は、その5'側にSpeIサイトを、3'側にEcoRIサイトをそれぞれ有している(図1)。Throm-F2は、トロンビン切断部分のDNA配
- 15 列の下流には、BamHIサイト、NdeIサイトを有しているため、目的タンパク質の遺伝子断片をこれらの制限酵素サイトを利用して導入することにより、TcFKBP18 との融合タンパク質を得ることができる(図1)。

- 上記TcFKBP18の遺伝子断片と、トロンビン切断部分をコードするDNA断片とを、各々の制限酵素で処理し、あらかじめNcoI/EcoRIにて処理したpET21dプラスミドDNA(ノバジェン社製)に、TcFKBP18
- 20 遺伝子-Throm-F2の順でライゲーションした。得られたTcFKBP18 融合タンパク質発現用プラスミドをTcFKfusion2とした。

表 1

Abbrev.	Sequence	Restriction site
Tcfu-F1	5'-GGCCATGGGAAAAGTTGAAGCTGGTGAT-3'	<i>Nco</i> I
Tcfu-R2	5'-CCACTAGTAGCTTCTGAGTCCTCTTC-3'	<i>Spe</i> I
TF-F1	5'-GGCCATGGGCCAAGTTTCAGTTGAAACC-3'	<i>Nco</i> I
TF-R1	5'-CCACTAGTCGCCTGCTGGTTCATCAGCT-3'	<i>Spe</i> I
FK52-F1	5'-GGCCATGGGCACAGCCGAGGAGATGAA-3'	<i>Nco</i> I
FK52-R1	5'-CCACTAGTTGCTTCTGTCTCCACCTGA-3'	<i>Spe</i> I
CP40-F1	5'-GGCCATGGGCTCGCACCCGTCCCC -3'	<i>Nco</i> I
CP40-R1	5'-CCACTAGTAGCAAACATTTTTGCATATACTG-3'	<i>Spe</i> I
FKPA-F1	5'-GGCCATGGGCAAATCACTGTTTAAAGTAACGC-3'	<i>Nco</i> I
FKPA-R1	5'-CCACTAGTTTTTTTAGCAGAGTCTGCGGC-3'	<i>Spe</i> I
SUR-F1	5'-GGCCATGGGCAAGAACTGGAAAACGCTG-3'	<i>Nco</i> I
SUR-R1	5'-CCACTAGTGTTGCTCAGGATTTTAACGTA-3'	<i>Spe</i> I
SCF-F3	5'-ATCATATGAAATACCTATTGCCTACG-3'	<i>Nde</i> I
SCF-R3	5'-ATGCGGCCGCTATTACTCCAGCTTGGTCCCTC-3'	<i>Not</i> I

アンダーライン：各制限酵素サイト

(実施例 2) 大腸菌由来トリガーファクタータイプ P P I a s e (TF) と融合するための発現ベクター構築

大腸菌由来トリガーファクタータイプ P P I a s e (TF) と融合するための発現ベクターを構築するために、大腸菌 K 1 2 株から、終止コドンを除いた TF 遺伝子を P C R にて増幅した。P C R 用のプライマーとして、表 1 に示した TF - F 1 及び TF - R 1 を用いることにより増幅産物の両端に制限酵素サイトを設けた。P C R 産物を p T 7 ブルー T ベクターに挿入後、シーケンスが登録情報と相違ないことを確認した。一方、実施例 1 で調製した T c F K f u s i o n 2 を N c o I / S p e I 処理し、T c F K B P 1 8 遺伝子を除いたベクターをアガロ

ースゲル電気泳動にて精製した。TF遺伝子を含むpT7ブルーTベクターをNcoI/SpeI処理し、切り出されたTF遺伝子を回収した。得られたTF遺伝子と上記ベクターとをライゲーションし、TF遺伝子全長を含むベクターを回収した。これにより、実施例1のTcFKfusion2におけるTcFKBP18遺伝子がTF遺伝子に置き換わった、TF融合タンパク質発現系が構築できた。得られたTF融合タンパク質発現用プラスミドをTFf2とした。

(実施例3) ヒト由来FKBP52タイプPPiaseと融合するための発現ベクター構築

ヒト由来FKBP52タイプPPiase (hFKBP52) と融合するための発現ベクターを構築するために、ヒトcDNAライブラリーから、終止コドンを除いたFKBP52遺伝子をPCRにて増幅した。PCR用のプライマーとして、表1に示したFK52-F1及びFK52-R1を用いることにより増幅産物の両端に制限酵素サイトを設けた。PCR産物をpT7ブルーTベクターに挿入後、シーケンスが登録情報と相違ないことを確認した。一方、実施例1で調製したTcFKfusion2をNcoI/SpeI処理し、TcFKBP18遺伝子を除いたベクターをアガロースゲル電気泳動にて精製した。hFKBP52遺伝子を含むpT7ブルーTベクターをNcoI/SpeI処理し、切り出されたhFKBP52遺伝子の断片を回収した。得られたhFKBP52遺伝子断片と上記ベクターとをライゲーションし、hFKBP52遺伝子全長を含むベクターを回収した。これにより、実施例1のTcFKfusion2におけるTcFKBP18遺伝子がhFKBP52遺伝子に置き換わったhFKBP52との融合タンパク質発現系が構築できた。得られたhFKBP52融合タンパク質発現用プラスミドをFK52f2とした。

(実施例4) ヒト由来CYP40タイプPPiaseと融合するための発現ベクター構築

ヒト由来CYP40タイプPPiase (CYP40) と融合するための発現ベクターを構築するために、ヒトcDNAライブラリーから、終止コドンを除い

たhCyP40遺伝子をPCRにて増幅した。PCR用のプライマーとして、表1に示したCP40-F1及びCP40-R1を用いることにより増幅産物の両端に制限酵素サイトを設けた。PCR産物をpT7ブルーTベクターに挿入後、シーケンスが登録情報と相違ないことを確認した。一方、実施例1で調製したTcFKfusion2をNcoI/SpeI処理し、TcFKBP18遺伝子を除いたベクターをアガロースゲル電気泳動にて精製した。hCyP40遺伝子を含むpT7ブルーTベクターをNcoI/SpeI処理し、切り出されたhCyP40遺伝子を回収した。得られたhCyP40遺伝子と上記ベクターとをライゲーションし、hCyP40遺伝子全長を含むベクターを回収した。これにより、  
10 実施例1のTcFKfusion2におけるTcFKBP18遺伝子がhCyP40遺伝子に置き換わったhCyP40との融合タンパク質発現系が構築できた。得られたhCyP40融合タンパク質発現用プラスミドをCP40f2とした。

15 (実施例5) 大腸菌由来FkpAタイプPPiaseと融合するための発現ベクター構築

大腸菌由来FkpAタイプPPiase (FkpA) と融合するための発現ベクターを構築するために、大腸菌CTF073株から、終止コドンを除いたFkpA遺伝子をPCRにて増幅した。PCR用のプライマーとして、表1に示したFKPA-F1及びFKPA-R1を用いることにより増幅産物の両端に制限酵素サイトを設けた。PCR産物をpT7ブルーTベクターに挿入後、シーケンスが登録情報と相違ないことを確認した。一方、実施例1で調製したTcFKfusion2をNcoI/SpeI処理し、TcFKBP18遺伝子を除いたベクターをアガロースゲル電気泳動にて精製した。FkpA遺伝子を含むpT7ブルーTベクターをNcoI/SpeI処理し、切り出されたFkpA遺伝子を回収  
25 した。得られたFkpA遺伝子と上記ベクターとをライゲーションし、FkpA遺伝子全長を含むベクターを回収した。これにより、実施例1のTcFKfusion2におけるTcFKBP18遺伝子がFkpA遺伝子に置き換わったFkpAとの融合タンパク質発現系が構築できた。得られたFkpA融合タンパク質発現用プラスミドをFkpAf2とした。

(実施例6) 大腸菌由来S u r AタイプP P I a s eと融合するための発現ベクター構築

大腸菌由来S u r AタイプP P I a s e (S u r A) と融合するための発現ベクターを構築するために、大腸菌K12株から、終止コドンを除いたS u r A遺伝子をP C Rにて増幅した。P C R用のプライマーとして、表1に示したS U R - F 1及びS U R - R 1を用いることにより増幅産物の両端に制限酵素サイトを設けた。P C R産物をp T 7ブルーTベクターに挿入後、シーケンスが登録情報と相違ないことを確認した。一方、実施例1で調製したT c F K f u s i o n 2をN c o I / S p e I処理し、T c F K B P 1 8遺伝子を除いたベクターをアガロースゲル電気泳動にて精製した。S u r A遺伝子を含むp T 7ブルーTベクターをN c o I / S p e I処理し、切り出されたS u r A遺伝子を回収した。得られたS u r A遺伝子と上記ベクターとをライゲーションし、S u r A遺伝子全長を含むベクターを回収した。これにより、実施例1のT c F K f u s i o n 2におけるT c F K B P 1 8遺伝子がS u r A遺伝子に置き換わったS u r Aとの融合タンパク質発現系が構築できた。得られたS u r A融合タンパク質発現用プラスミドをS u r A f 2とした。

(実施例7) T c F K f u s i o n 2を用いたT c F K B P 1 8の発現

実施例1で調製したT c F K f u s i o n 2によりE. c o l i B L 2 1 ( D E 3 ) 株をトランスフォーメーションした。2 Lの三角フラスコに2 × Y T 培地 ( Y e a s t E x t r u c t 1 6 g / L、B A C T O T R Y P T O N 2 0 g / L、N a C l 5 g / L、アンピシリン 1 0 0 μ g / m L、p H 7. 5 ) 7 0 0 m Lを入れ、組み換え大腸菌2 ~ 3 白金耳を接種した。3 5 ° Cで2 4 時間回転培養 ( 1 1 0 r p m ) した後、遠心分離 ( 1 0 0 0 0 r p m × 1 0 m i n ) にて菌体を回収した。得られた菌体は1 m M E D T Aを含む2 5 m M H E P E S 緩衝液 ( p H 6. 8 ) 2 0 m Lに懸濁し、- 2 0 ° Cにて凍結保存した。

得られた菌液を超音波破碎後、遠心分離し、その上清 ( 可溶性画分 ) と沈殿部 ( 沈殿画分 ) に分離した。沈殿画分は、更に封入体画分に精製するため、4 %

T r i t o n X-100を含む25mM HEPES/1mM EDTA緩衝液 (pH6.8) に懸濁後、30分間反応させることで膜成分を可溶化し、遠心分離にて沈殿する封入体成分を回収した。この操作を2回繰り返す、得られた沈殿部を封入体画分とした。可溶性画分10 $\mu$ gと、それに相当する封入体画分の容量をそれぞれ16% SDS-PAGEに供した。その結果、T c F K B P 18に相当するバンドは、可溶性画分のみに見られた。本来T c F K B P 18が検出させる位置よりも見かけ上高分子量の位置に検出されたが (図2)、これは、T c F K B P 18の構造遺伝子の3'末端に終止コドンが存在せず、マルチクロニングサイトが存在するため、その翻訳産物がT c F K B P 18のC末端に連なっているためであると考えられる。

(実施例8) T c F K B P 18とマウス由来 a n t i -ニワトリリゾチーム (H E L) F a b 抗体フラグメント (D 1. 3) からなる融合タンパク質の発現

マウス由来 a n t i -H E L F a b 抗体フラグメントの発現プラスミド p E H E L F a b -1 (I d e n o, A p p l. E n v. M i c r o b i o l. 68, 464-、2002) を N d e I / B p u 1 1 0 2 I により処理し、アガロースゲルを用いた電気泳動法により、a n t i -H E L F a b 抗体フラグメント遺伝子断片を精製した。あらかじめ N d e I / B p u 1 1 0 2 I 処理しておいた T c F K f u s i o n 2 に、このDNA断片をライゲーションした。この結果得られたプラスミドを発現すると、上記 F a b の重鎖部分は T c F K B P 18 との融合タンパク質として発現され、軽鎖部分は融合タンパク質になることなく、単独で発現することとなる。得られたプラスミドを、実施例7と同様の方法で大腸菌に組み込み、そのトランスフォーマントを取得した。本菌を実施例7と同様の方法で培養・回収し、-20℃にて凍結保存した。

得られた菌液を超音波破碎後、遠心分離し、その上清 (可溶性画分) と沈殿部 (沈殿画分) に分離し、実施例7と同様の方法により SDS-PAGE に供した。SDS-PAGEゲルは、クーマシーブリリアントブルー (C B B) による染色と、ウサギ由来抗 D 1. 3 抗体を1次抗体として用いたウェスタンブロッティング法により、発現した F a b を特異的に検出した。

宿主菌である大腸菌の可溶性画分及び沈殿画分には、C B B 染色、ウエスタン  
ブロッティングによる検出のいずれにおいても、F a b と T c F K B P 1 8 との  
融合タンパク質に相当するバンドは見られなかった（図 3）。一方、T c F K B  
P 1 8 との融合タンパク質として発現させた場合、C B B 染色において、F a b  
5 の重鎖部分は T c F K B P 1 8 と融合した形態で可溶画分にメジャーバンドとし  
て発現されることが示され、ウエスタンブロッティングにおいても、確かに F a  
b が大量に発現していることが明らかとなった（図 4）。C B B 染色において、  
可溶性画分に発現した融合タンパク質のバンド密度をデンストメータで測定した  
結果、大腸菌由来全可溶性タンパク質の約 1 0 % であった。それに対し、F a b  
10 の軽鎖部分に相当するバンドは見られなかった。ウエスタンブロッティングの結  
果より、F a b の軽鎖は宿主由来のプロテアーゼで分解していると考えられた（  
図 4）。

（比較例 1）マウス由来 a n t i - H E L F a b 抗体フラグメントの単体での  
15 発現

マウス由来 a n t i - H E L F a b 抗体フラグメントの発現プラスミド p  
E H E L F a b - 1 を実施例 7 と同様の方法で大腸菌に組み込み、S D S - P A  
G E に供した。C B B 染色及びウエスタンブロッティングの結果、F a b 遺伝子  
は、単独では可溶画分への発現は見られず、すべて沈殿画分に発現することが確  
20 認された（図 5）。

（実施例 9）マウス由来 a n t i - H E L s c F v と T c F K B P 1 8 との融  
合タンパク質の発現

マウス由来 a n t i - H E L s c F v フラグメントの発現プラスミド p A A  
25 L S C （伊庭ら 1 9 9 7、G e n e 1 9 4、3 5 -）を鋳型とし、表 1 に示  
した S C F - F 3 及び S C F - R 3 をプライマーして用いる P C R により、マウ  
ス由来 a n t i - H E L s c F v フラグメントの遺伝子を増幅した。この遺伝  
子を T A クローニングにより、p T 7 ブルーベクターにライゲーションし、N d  
e I / N o t I 処理後、あらかじめ同制限酵素により処理しておいた T c F K f



u s i o n 2 に再度ライゲーションすることで、T c F K B P 1 8 と s c F v との融合タンパク質発現系を構築した。得られたプラスミドを、実施例 7 と同様の方法で大腸菌に組み込み、そのトランスフォーマントを取得した。本菌を実施例 7 と同様の方法で培養・回収し、 $-20^{\circ}\text{C}$ にて凍結保存した。得られた菌液を

5 実施例 7 と同様の方法で S D S - P A G E に供し、C B B にて染色した。

宿主菌である大腸菌の可溶性画分及び沈殿画分には、C B B 染色においてマウス由来 a n t i - H E L s c F v と T c F K B P 1 8 との融合タンパク質に相当するバンドは見られなかった（図 6 A）。一方、T c F K B P 1 8 との融合タンパク質として発現させた場合、マウス由来 a n t i - H E L s c F v は T c F K B P 1 8 と融合した形態で可溶画分にメジャーバンドとして大量に発現されることが示された（図 6 B）。C B B 染色において、可溶性画分に発現した融合タンパク質のバンド密度をデンストメータで測定した結果、大腸菌由来全可溶性タンパク質の約 1 4 % であった。

15 （比較例 2）マウス由来 a n t i - H E L s c F v の単体での発現

実施例 9 で得られたマウス由来 a n t i - H E L s c F v 遺伝子を含む p T 7 ブルーベクターを N d e I / N o t I 処理後、あらかじめ同制限酵素により処理しておいた p E T 2 1 a （ノバジェン社製）に再度ライゲーションすることで、マウス由来 a n t i - H E L s c F v の発現系を構築した。得られた発現プラスミドを実施例 9 と同様の方法で大腸菌に組み込み、そのトランスフォーマントを取得した。本菌を実施例 7 と同様の方法で培養・回収し、 $-20^{\circ}\text{C}$ にて凍結保存した。得られた菌液を実施例 7 に示した方法と同様に S D S - P A G E に供し、C B B にて染色した。その結果、マウス由来 a n t i - H E L s c F v は可溶画分にはほとんど発現せず、ほとんどが不溶性画分に発現することが確認された（図 6 C）。

（実施例 1 0）マウス由来 a n t i - H E L s c F v と T F との融合タンパク質の発現

実施例 9 で調製したマウス由来 a n t i - H E L s c F v フラグメントを含

む p T 7 ブルーベクターの N d e I / N o t I 処理 DNA 断片を、あらかじめ同制限酵素により処理しておいた実施例 2 の T F f 2 にライゲーションすることにより、T F と s c F v との融合タンパク質発現系を構築した。得られたプラスミドを、実施例 7 と同様の方法で大腸菌に組み込み、そのトランスフォーマントを  
5 取得した。本菌を実施例 7 と同様の方法で培養・回収し、 $-20^{\circ}\text{C}$  にて凍結保存した。得られた菌液を実施例 7 と同様の方法で SDS-PAGE に供し、CBB にて染色した。比較例 2 で示したように、s c F v 単独で発現させた場合には s c F v は不溶性画分に発現したのに対し、T F と融合発現させた場合、可溶性画分に大量に発現されることがわかった。CBB 染色において、可溶性画分に発現  
10 した融合タンパク質のバンド密度をデンストメータで測定した結果、大腸菌由来全可溶性タンパク質の約 7 % であった。

(実施例 11) マウス由来 a n t i - H E L s c F v と h F K B P 5 2 との融合タンパク質の発現

15 実施例 9 で調製した T c F K B P 1 8 と s c F v との融合タンパク質発現ベクターを S p e I / N o t I 処理し、s c F v フラグメントを含む DNA 断片を調製した。あらかじめ同制限酵素により処理しておいた実施例 3 の F K 5 2 f 2 に上記 DNA 断片をライゲーションすることにより、h F K B P 5 2 と s c F v との融合タンパク質発現系を構築した。得られたプラスミドを、実施例 7 と同様の  
20 方法で大腸菌に組み込み、そのトランスフォーマントを取得した。本菌を実施例 7 と同様の方法で培養・回収し、 $-20^{\circ}\text{C}$  にて凍結保存した。得られた菌液を実施例 7 と同様の方法で SDS-PAGE に供し、CBB にて染色した。h F K B P 5 2 と融合発現させた場合、可溶性画分に大量に発現されることがわかった。CBB 染色において、可溶性画分に発現した融合タンパク質のバンド密度をデン  
25 シトメータで測定した結果、大腸菌由来全可溶性タンパク質の約 9 % であった。

(実施例 12) マウス由来 a n t i - H E L s c F v と h C y P 4 0 との融合タンパク質の発現

実施例 11 の F K 5 2 f 2 の代わりに、実施例 4 で調製した C P 4 0 f 2 を用

いたこと以外は実施例 1 1 と同様の方法で h C y P 4 0 と s c F v との融合タンパク質を発現させた。C B B 染色において、可溶性画分に発現した融合タンパク質のバンド密度をデンストメータで測定した結果、大腸菌由来全可溶性タンパク質の約 1 1 % であった。

5

(実施例 1 3) ヒト由来セロトニンレセプターと F k p A との融合タンパク質の発現

7 回膜貫通型膜タンパク質の一つであるヒト由来セロトニンレセプター (H T 1 a レセプター) と大腸菌由来 F k p A との融合タンパク質発現系を構築するためにヒト c D N A ライブラリーから H T 1 a レセプター遺伝子のクローニングを行なった。すなわち、N C B I コード : H S S E R R 5 1 として登録されている塩基配列情報を元に P C R 用のプライマーを設計し、ヒト c D N A ライブラリーを鋳型とした P C R により、H T 1 a レセプター遺伝子を増幅した。

H T 1 a のアミノ酸配列を配列番号 1 3 に示し、塩基配列を配列番号 1 4 に示した。プライマーには 5 ' 側に N d e I 制限酵素サイトを、3 ' 側に N o t I 制限酵素サイトをそれぞれ設けた。P C R 産物を p T 7 ブルー T ベクターに挿入後、シーケンスが登録情報と相違ないことを確認した。N d e I / N o t I 処理により、H T 1 a 遺伝子を含む DNA 断片を切断・精製後、あらかじめ N d e I / N o t I 処理しておいた実施例 5 の F k p A f 2 にライゲーションし、H T 1 a 遺伝子を含むベクターを回収した。得られた F k p A と H T 1 a との融合タンパク質発現ベクターを実施例 7 と同様の方法で大腸菌に組み込み、そのトランスフォーマントを取得した。本菌を実施例 7 と同様の方法で培養・回収し、- 2 0 ° C にて凍結保存した。得られた菌液を超音波破碎後、3 0 0 0 r p m にて遠心分離し、その上清 (可溶性画分) と沈殿部 (沈殿画分) に分画した。実施例 7 と同様の方法により S D S - P A G E に供し、クーマシーブリリアントブルー (C B B) による染色と、抗セロトニンレセプター抗体を用いたウエスタンブロッティング法により、発現した H T 1 a を特異的に検出した。その結果、C B B 染色において、H T 1 a は F k p A と融合した形態で可溶画分に発現されることが示され、ウエスタンブロッティングにおいても、確かに発現していることが確認された。C B

B染色において、可溶性画分に発現した融合タンパク質のバンド密度をデンストメータで測定した結果、大腸菌由来全可溶性タンパク質の約2%であった。

(実施例14) ヒト由来セロトニンレセプターとSurAとの融合タンパク質

5 の発現

実施例13のFkpAf2の代わりに、実施例6で調製したSurAf2を用いたこと以外は実施例13と同様の方法でSurAとHT1aとの融合タンパク質を発現させた。

10 実施例7と同様の方法によりSDS-PAGEに供し、クーマシーブリリアントブルー(CBB)による染色と、抗セロトニンレセプター抗体を用いたウェスタンブロットティング法により発現したHT1aを特異的に検出したところ、CBB染色において、HT1aはSurAと融合した形態で可溶画分に発現されることが示され、ウェスタンブロットティングにおいても、確かに発現していることが確認された。CBB染色において、可溶性画分に発現した融合タンパク質のバン  
15 ド密度をデンストメータで測定した結果、大腸菌由来全可溶性タンパク質の約2%であった。

(実施例15) マウス由来anti-HEL scFvとTcFKBP18との融合タンパク質の精製

20 実施例9で得られた可溶性画分を下記の(a)及び(b)の陰イオン交換クロマトグラフィー及びゲル濾過の順でカラム精製を繰り返すことにより、マウス由来anti-HEL scFvとTcFKBP18との融合タンパク質をほぼ単一にまで精製した。精製の結果得られた融合タンパク質の量は、培地1Lあたり約50mgであった。

25 (a) DEAE Toyopearl column (16mm×60cm; 東ソー社製)

A液: 25mM HEPES-KOH 緩衝液 (pH 6.8)

B液: 0.5M NaClを含む25mM HEPES-KOH緩衝液 (pH 6.8)

(0-300分: B液0-100%の直線グラジエント、300-420分:  
B液100%)

流速: 1 mL/分

(b) Hi Load 26/60 Superdex 200 pg column  
(26 mm × 60 cm; アマシャムファルマシア社製)

溶離液: 100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0; 0.15 M NaCl 含有)

流速: 3 mL/分

#### 10 (実施例 16) 融合タンパク質のトロンビンによる切断

実施例 15 で精製した融合タンパク質 1 mg 当たり、10 U のトロンビンを加え、22℃にて16時間処理することにより、融合タンパク質のトロンビンサイトを切断した。SDS-PAGEの結果、融合タンパク質は確かにマウス由来 anti-HEL scFv と TcFKBP18 とに切断されたことが確認された (図 7)。

#### (実施例 17) ELISA によるマウス由来 anti-HEL scFv の機能確認

発現で得られたマウス由来 anti-HEL scFv の機能は、ニワトリリゾチームを抗原とする ELISA 法において、1次抗体として機能するか否かで評価した。即ち、96穴プレートに 50 μg/mL ニワトリ卵白リゾチーム (HEL) 溶液 100 μL を添加し、30℃にて3時間インキュベーションすることにより、HEL をプレート上に固定化した。TBS 緩衝液 (pH 7.0) にてプレートを洗浄後、ブロックエース (大日本製薬社製) を含む TBS 緩衝液でブロッキングした (4℃、オーバーナイト)。TBS にて洗浄後、実施例 16 で得られたマウス由来 anti-HEL scFv 24 μg を含む TBS (10% ブロックエース含有) を用い、室温にて3時間インキュベートした。TBS にて洗浄後、2次抗体として Anti-マウス IgG-HRP コンジュゲート (フナコシ社製) を含む TBS 緩衝液でインキュベート (2時間、30℃) した。TB

Sにて洗浄後、HRPの基質としてABTS液（フナコシ社製）100  $\mu$ Lを加え、30分間インキュベートし、OD405を測定した。得られた結果を図8に示した。プレートに固定したHEL濃度に応じて、吸光度が増大することから（▲）、得られたscFvが抗原と結合していることが確認された。一方、HELの代わりに同濃度のキモトリプシンインヒビター（□）を用いた場合、吸光度の上昇は見られなかった。このことは発現して得られた抗体が特異的に抗原に結合することを示していると思われる。

#### 産業上の利用可能性

- 10 本発明は、上述の構成よりなるので、これまでバクテリアや酵母、昆虫細胞等を用いたタンパク質発現系において問題となっていた封入体の形成を防ぎ、正常型タンパク質を可溶性画分に大量に発現させることを可能とする。これにより、従来のようにインビトロで封入体を正常型タンパク質にリフォールディングするといった手間が不要となる。

## 請求の範囲

1. (a) 分子シャペロン活性を有するポリペプチドをコードする第1コード領域、及び、
  - 5 (b) タンパク質をコードする第2コード領域を挿入することができる少なくとも1つの制限酵素サイトを有する領域を含有し、  
前記第1コード領域は、プロモーターに有効に連結しており、  
前記制限酵素サイトは、第1コード領域と同じ解読枠内であって、前記第1コード領域の下流にある
- 10 ことを特徴とする発現ベクター。
  2. (a) 分子シャペロン活性を有するポリペプチドをコードする第1コード領域、及び、
    - 15 (b) タンパク質をコードする第2コード領域を挿入することができる少なくとも1つの制限酵素サイトを有する領域を含有し、  
前記制限酵素サイトは、挿入された前記第2コード領域がプロモーターに有効に連結するように配置されており、  
前記第1コード領域は、前記第2コード領域と同じ解読枠内にあって、前記第2コード領域の下流にある
  - 20 ことを特徴とする発現ベクター。
3. 第1コード領域と、第2コード領域を挿入することができる少なくとも1つの制限酵素サイトを有する領域との間にあり、同じ解読枠内で翻訳されてプロテアーゼ消化サイトとなる領域を有することを特徴とする請求の範囲第1又は2項
- 25 記載の発現ベクター。
  4. 請求の範囲第1、2又は3項記載の発現ベクターにタンパク質をコードする第2コード領域が組み込まれていることを特徴とする発現ベクター。

5. 分子シャペロン活性を有するポリペプチドは、分子シャペロン活性を有する P P I a s e であることを特徴とする請求の範囲第 1、2、3 又は 4 項記載の発現ベクター。

5 6. 分子シャペロン活性を有する P P I a s e は、FKBP 型 P P I a s e であることを特徴とする請求の範囲第 5 項記載の発現ベクター。

7. 分子シャペロン活性を有する P P I a s e は、シクロフィリン型 P P I a s e であることを特徴とする請求の範囲第 5 項記載の発現ベクター。

10

8. 分子シャペロン活性を有する P P I a s e は、パーブリン型 P P I a s e であることを特徴とする請求の範囲第 5 項記載の発現ベクター。

9. FKBP 型 P P I a s e は、古細菌由来 FKBP 型 P P I a s e であることを特徴とする請求の範囲第 6 項記載の発現ベクター。

15

10. 古細菌由来 FKBP 型 P P I a s e は、ショートタイプ FKBP 型 P P I a s e であることを特徴とする請求の範囲第 9 項記載の発現ベクター。

20 11. 分子シャペロン活性を有する P P I a s e は、古細菌由来 FKBP 型 P P I a s e の I F ドメイン、及び／又は、C 末端ドメインを含有していることを特徴とする請求の範囲第 5、6、7 又は 8 項記載の発現ベクター。

25 12. FKBP 型 P P I a s e は、トリガーファクタータイプ P P I a s e であることを特徴とする請求の範囲第 6 項記載の発現ベクター。

13. 分子シャペロン活性を有する P P I a s e は、トリガーファクタータイプ P P I a s e の N 末端ドメイン、及び／又は、C 末端ドメインを含有していることを特徴とする請求の範囲第 5、6、7 又は 8 項記載の発現ベクター。



14. FKBP型PPIaseは、FkpAタイプPPIaseであることを特徴とする請求の範囲第6項記載の発現ベクター。

5 15. 分子シャペロン活性を有するPPIaseは、FkpAタイプPPIaseのN末端ドメインを含有していることを特徴とする請求の範囲第5、6、7又は8項記載の発現ベクター。

10 16. FKBP型PPIaseは、FKBP52タイプPPIaseであることを特徴とする請求の範囲第6項記載の発現ベクター。

17. 分子シャペロン活性を有するPPIaseは、FKBP52タイプPPIaseのC末端ドメインを含有していることを特徴とする請求の範囲第5、6、7又は8項記載の発現ベクター。

15

18. シクロフィリン型PPIaseは、Cyp40タイプPPIaseであることを特徴とする請求の範囲第7項記載の発現ベクター。

20 19. 分子シャペロン活性を有するPPIaseは、Cyp40タイプPPIaseのC末端ドメインを含有していることを特徴とする請求の範囲第5、6、7又は8項記載の発現ベクター。

20. パーブリン型PPIaseは、SurAタイプPPIaseであることを特徴とする請求の範囲第8項記載の発現ベクター。

25

21. 分子シャペロン活性を有するPPIaseは、SurAタイプPPIaseのN末端ドメインを含有していることを特徴とする請求の範囲第5、6、7又は8項記載の発現ベクター。

22. 第2コード領域は、モノクローナル抗体をコードする塩基配列を有することを特徴とする請求の範囲第4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20又は21項記載の発現ベクター。

5 23. 第2コード領域は、膜タンパク質をコードする塩基配列を有することを特徴とする請求の範囲第4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20又は21項記載の発現ベクター。

10 24. 請求の範囲第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22又は23項記載の発現ベクターを内包していることを特徴とする宿主。

25. 大腸菌であることを特徴とする請求の範囲第24項記載の宿主。

15 26. 分子シャペロン活性を有するポリペプチド及び第2コード領域がコードするタンパク質を含有することを特徴とする融合タンパク質。

27. プロテアーゼ消化サイトを含有することを特徴とする請求の範囲第26項記載の融合タンパク質。

20

28. 分子シャペロン活性を有するポリペプチド及び第2コード領域がコードするタンパク質を含有する融合タンパク質を製造する方法であって、

25 請求の範囲第4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22又は23項記載の発現ベクターを内包する宿主を、前記発現ベクターの発現条件下で培養し、前記融合タンパク質を細胞質に発現させることを特徴とする融合タンパク質の製造方法。

29. 分子シャペロン活性を有するポリペプチド及び第2コード領域がコードするタンパク質を含有する融合タンパク質を製造する方法であって、

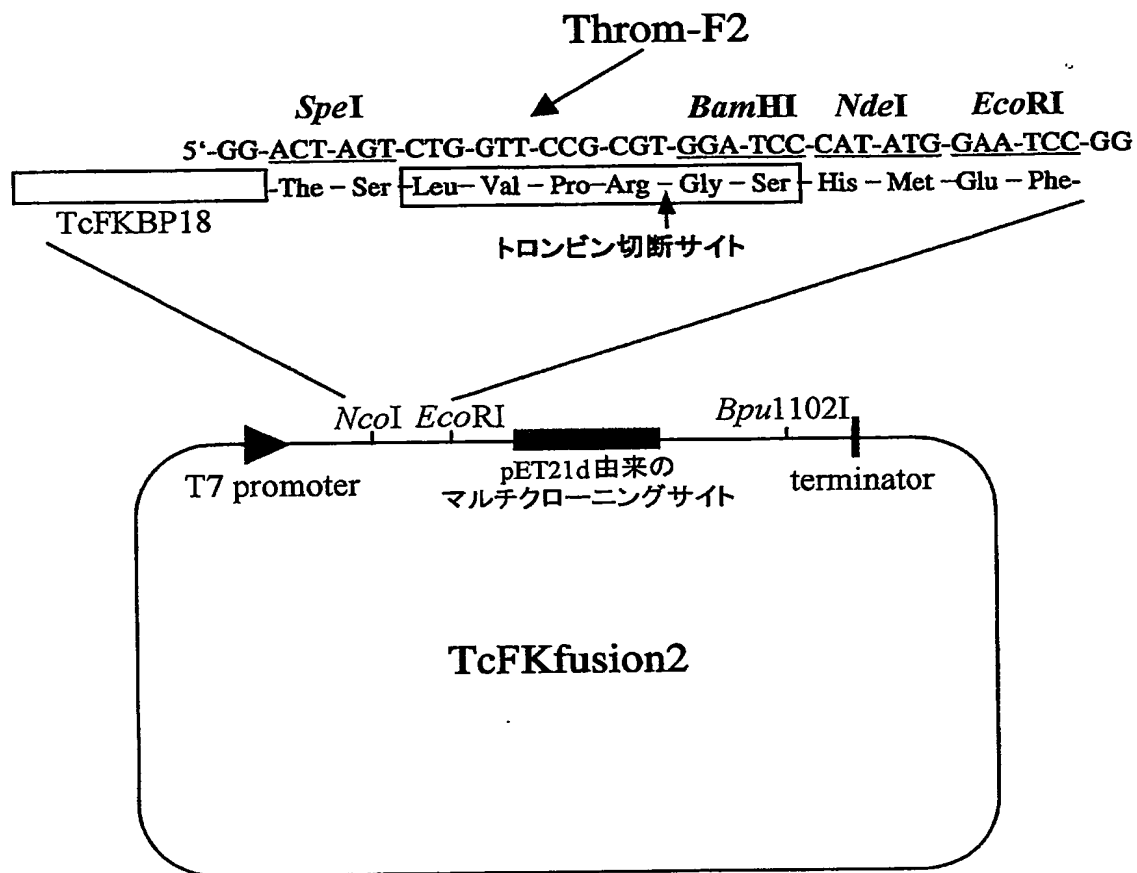
請求の範囲第4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、  
16、17、18、19、20、21、22又は23項記載の発現ベクターの第  
1コード領域の5'末端又は第2コード領域の5'末端に転写及び翻訳されてシ  
グナル配列となる領域を設けて、前記発現ベクターを内包する宿主を、前記発現  
5ベクターの発現条件下で培養し、前記融合タンパク質をペリプラズム又は培地に  
発現させることを特徴とする融合タンパク質の製造方法。

30. 分子シャペロン活性を有するポリペプチド及び第2コード領域がコードす  
るタンパク質を含有する融合タンパク質を製造する方法であって、  
10 請求の範囲第4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、  
16、17、18、19、20、21、22又は23項記載の発現ベクターに、  
無細胞翻訳系において、前記融合タンパク質を発現させることを特徴とする融合  
タンパク質の製造方法。

15 31. PPIase活性を阻害するマクロライド、シクロスポリン、ジユグロン  
、又は、これらの類縁化合物を担持した担体に、融合タンパク質を吸着させた後  
、前記担体を回収することを特徴とする請求の範囲第28、29又は30項記載  
の融合タンパク質の製造方法。

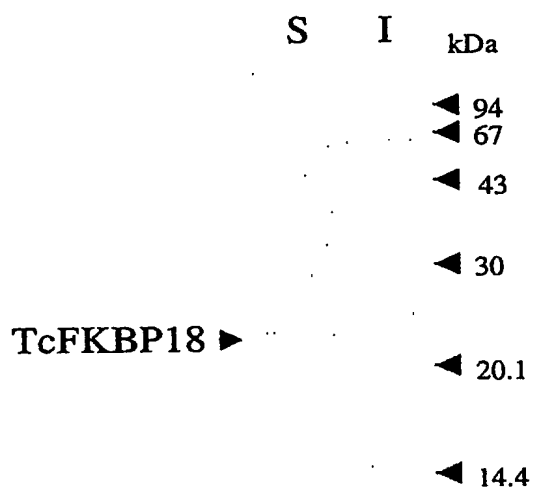
20 32. 第2コード領域がコードするタンパク質を製造する方法であって、請求の  
範囲第28、29、30又は31項記載の方法で得られた融合タンパク質をプロ  
テアーゼ消化サイトを消化するプロテアーゼで消化することを特徴とするタンパ  
ク質の製造方法。

図 1



2 / 5

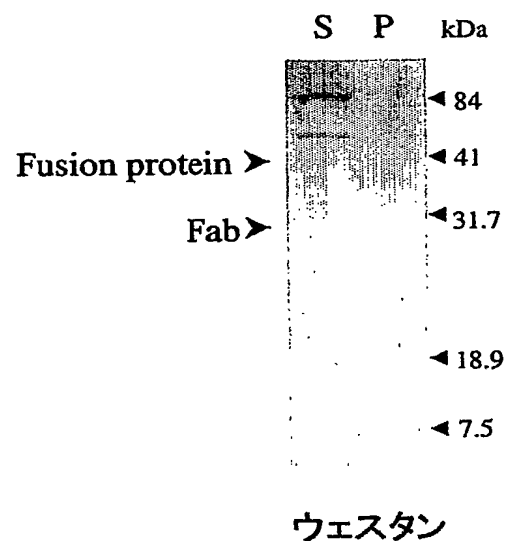
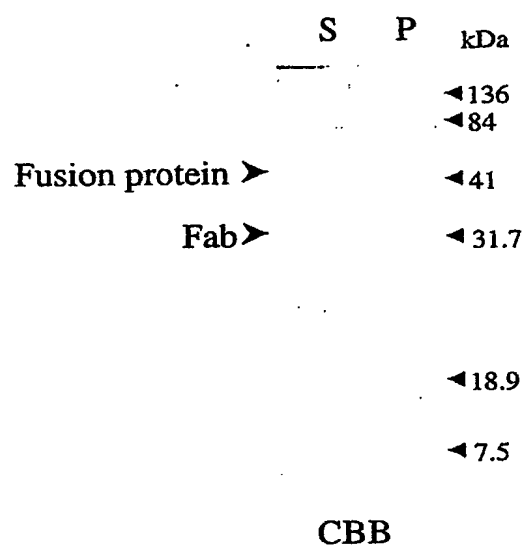
図 2



S: 可溶画分  
I: 封入体画分

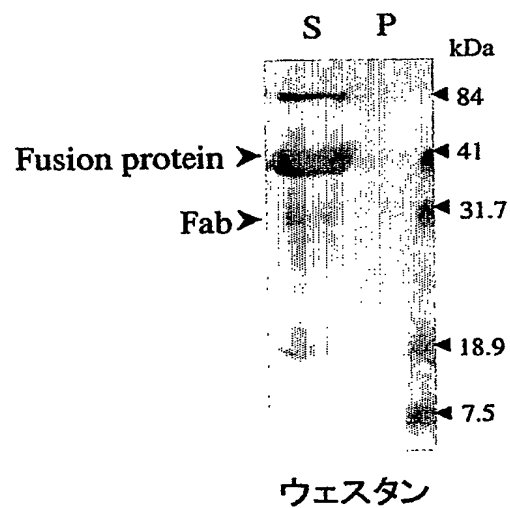
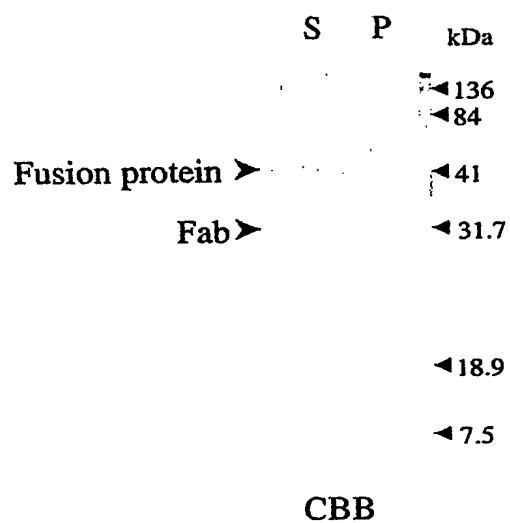
3 / 5

図 3



S: 可溶画分  
P: 沈殿画分

図 4



S: 可溶画分  
P: 沈殿画分

4 / 5

図 5

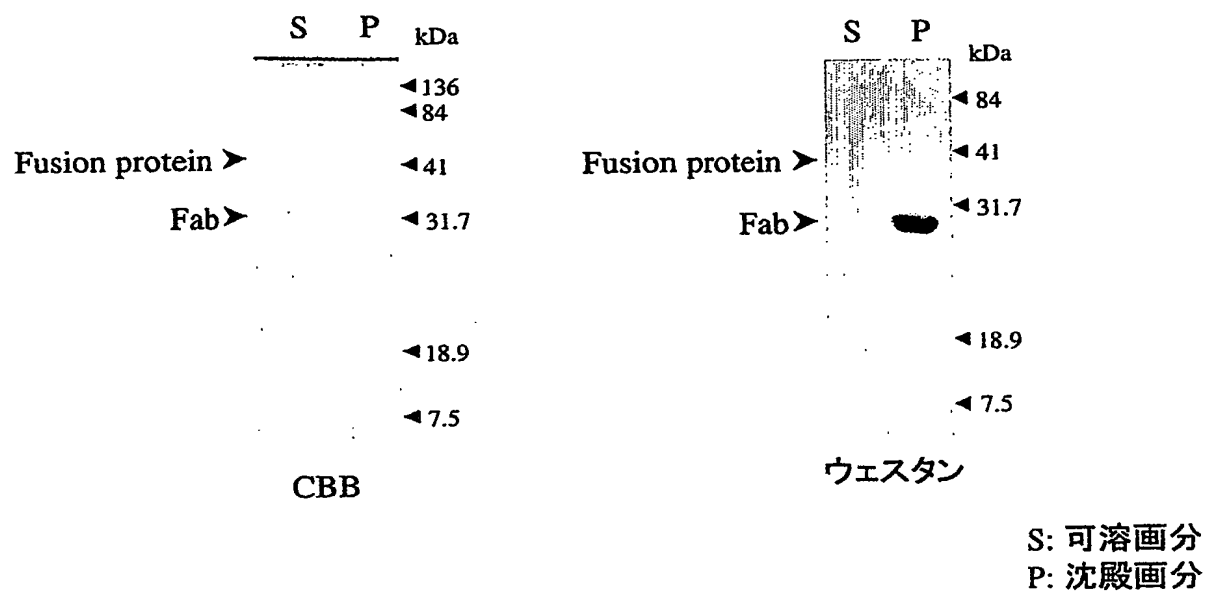
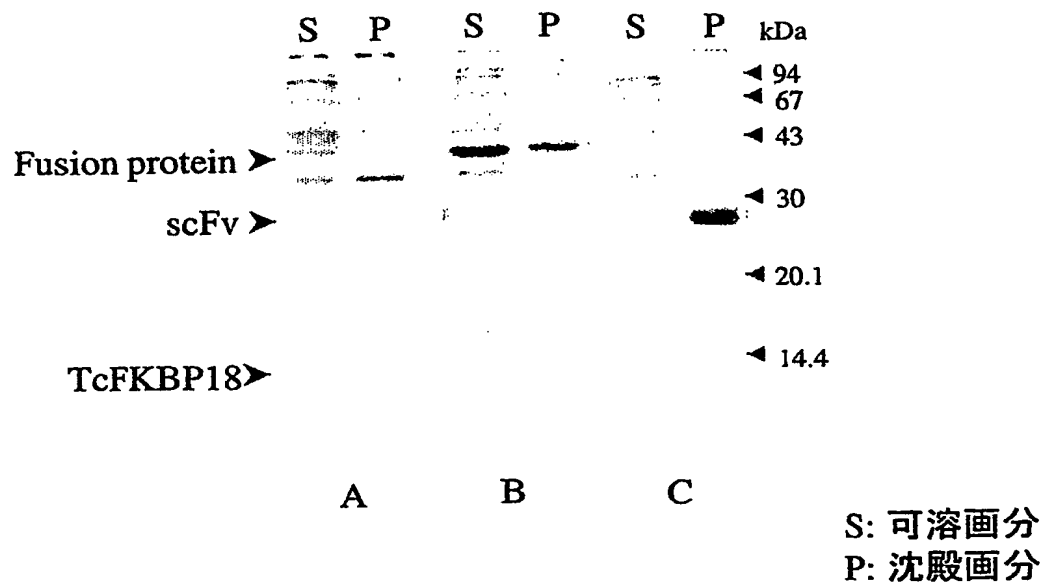


図 6



5 / 5

図 7

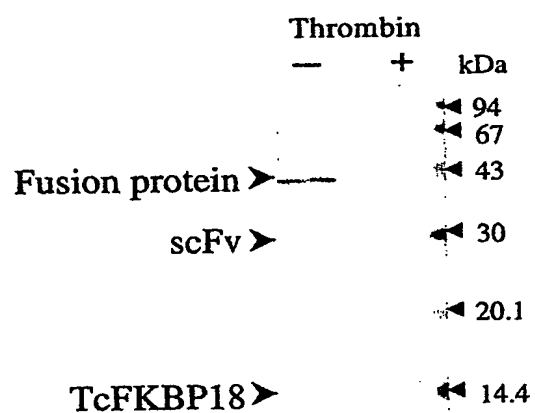
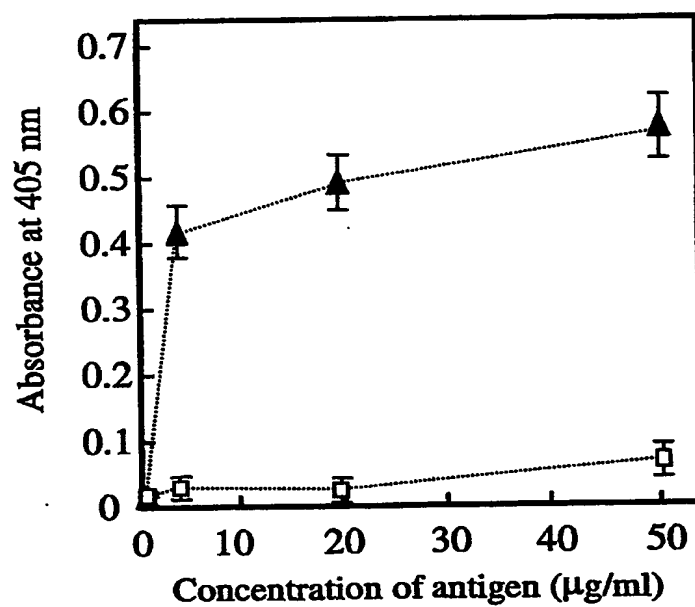


図 8





## SEQUENCE LISTING

<110> 積水化学工業株式会社 Sekisui Chemical Co., Ltd.

株式会社海洋バイオテクノロジー研究所 Marine Biotechnology Institute Co., Ltd.

<120> 発現ベクター、宿主、融合タンパク質、融合タンパク質の製造方法及びタンパク質の製造方法

10 <130> 02P00846

<150> JP P2002-185020

<151> 2002-06-25

15 <160> 14

<210> 1

<211> 257

<212> PRT

20 <213> Pyrococcus horikoshii

<400> 1

Met Lys Val Glu Arg Gly Asp Val Ile Arg Leu His Tyr Thr Gly Arg

1

5

10

15

25 Val Lys Glu Thr Gly Gln Ile Phe Asp Thr Thr Tyr Glu Glu Val Ala

20

25

30

Lys Glu Ala Gly Ile Tyr Asn Pro Lys Gly Ile Tyr Gly Pro Val Pro

35

40

45

Ile Ile Val Gly Ala Gly His Val Ile Ser Gly Leu Asp Lys Arg Leu

2/21

Val Gly Leu Glu Val Gly Lys Lys Tyr Thr Leu Glu Val Pro Pro Glu  
 65 70 75 80  
 Glu Gly Phe Gly Leu Arg Asp Pro Lys Leu Ile Lys Val Phe Thr Met  
 85 90 95  
 5 Gly Gln Phe Arg Lys Gln Gly Ile Val Pro Phe Pro Gly Leu Glu Val  
 100 105 110  
 Glu Val Thr Thr Asp Asn Gly Arg Lys Met Lys Gly Arg Val Ile Thr  
 115 120 125  
 Val Ser Gly Gly Arg Val Arg Val Asp Phe Asn His Pro Leu Ala Gly  
 10 130 135 140  
 Lys Thr Leu Ile Tyr Glu Val Glu Ile Val Glu Lys Ile Glu Asp Pro  
 145 150 155 160  
 Ile Glu Lys Ile Lys Ala Leu Ile Glu Leu Arg Leu Pro Met Ile Asp  
 165 170 175  
 15 Arg Asp Lys Val Ile Ile Glu Val Gly Glu Lys Asp Val Lys Val Asn  
 180 185 190  
 Phe Gly Glu Gln Asp Val Asp Pro Lys Thr Leu Ile Leu Gly Glu Ile  
 195 200 205  
 Leu Leu Glu Ser Asp Ile Lys Phe Leu Gly Tyr Glu Lys Val Glu Phe  
 20 210 215 220  
 Lys Pro Ser Val Glu Glu Leu Leu Arg Pro Lys Gln Glu Glu Pro Val  
 225 230 235 240  
 Glu Glu Glu Lys Lys Glu Glu Gln Glu Glu Ser Glu Glu Ala Gln Ser  
 245 250 255  
 25 Ser

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 157

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Methanococcus jannaschii

&lt;400&gt; 2

5 Leu Ile Asn Leu Ile Lys Lys Gly Asp Tyr Val Lys Val Asp Tyr Ile  
1 5 10 15  
Leu Glu Val Asp Gly Lys Val Ile Asp Thr Ser Ile Glu Glu Val Ala  
20 25 30  
Lys Glu Asn Lys Ile Tyr Tyr Pro Glu Arg Glu Tyr Glu Pro Ile Gly  
10 35 40 45  
Phe Ile Val Gly Asn Gly Glu Leu Ile Glu Gly Phe Glu Glu Ala Val  
50 55 60  
Ile Gly Met Glu Val Gly Glu Glu Lys Thr Val Thr Ile Pro Pro Glu  
65 70 75 80  
15 Lys Gly Tyr Gly Leu Arg Asp Glu Arg Leu Ile Gln Glu Ile Pro Lys  
85 90 95  
Glu Met Phe Ala Asp Ala Asp Phe Glu Pro Gln Glu Gly Met Leu Ile  
100 105 110  
Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Lys Ile Ile Lys Val Thr Asp Asp Thr  
20 115 120 125  
Val Thr Leu Asp Phe Asn His Glu Leu Ala Gly Lys Glu Leu Lys Phe  
130 135 140  
Thr Ile Lys Val Arg Asp Val Gln Pro Ala Glu Ser Glu  
145 150 155

25

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 432

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Escherichia coli

&lt;400&gt; 3

Met Gln Val Ser Val Glu Thr Thr Gln Gly Leu Gly Arg Arg Val Thr  
5 1 5 10 15  
Ile Thr Ile Ala Ala Asp Ser Ile Glu Thr Ala Val Lys Ser Glu Leu  
20 25 30  
Val Asn Val Ala Lys Lys Val Arg Ile Asp Gly Phe Arg Lys Gly Lys  
35 40 45  
10 Val Pro Met Asn Ile Val Ala Gln Arg Tyr Gly Ala Ser Val Arg Gln  
50 55 60  
Asp Val Leu Gly Asp Leu Met Ser Arg Asn Phe Ile Asp Ala Ile Ile  
65 70 75 80  
Lys Glu Lys Ile Asn Pro Ala Gly Ala Pro Thr Tyr Val Pro Gly Glu  
15 85 90 95  
Tyr Lys Leu Gly Glu Asp Phe Thr Tyr Ser Val Glu Phe Glu Val Tyr  
100 105 110  
Pro Glu Val Glu Leu Gln Gly Leu Glu Ala Ile Glu Val Glu Lys Pro  
115 120 125  
20 Ile Val Glu Val Thr Asp Ala Asp Val Asp Gly Met Leu Asp Thr Leu  
130 135 140  
Arg Lys Gln Gln Ala Thr Trp Lys Glu Lys Asp Gly Ala Val Glu Ala  
145 150 155 160  
Glu Asp Arg Val Thr Ile Asp Phe Thr Gly Ser Val Asp Gly Glu Glu  
25 165 170 175  
Phe Glu Gly Gly Lys Ala Ser Asp Phe Val Leu Ala Met Gly Gln Gly  
180 185 190  
Arg Met Ile Pro Gly Phe Glu Asp Gly Ile Lys Gly His Lys Ala Gly  
195 200 205

Glu Glu Phe Thr Ile Asp Val Thr Phe Pro Glu Glu Tyr His Ala Glu  
210 215 220  
Asn Leu Lys Gly Lys Ala Ala Lys Phe Ala Ile Asn Leu Lys Lys Val  
225 230 235 240  
5 Glu Glu Arg Glu Leu Pro Glu Leu Thr Ala Glu Phe Ile Lys Arg Phe  
245 250 255  
Gly Val Glu Asp Gly Ser Val Glu Gly Leu Arg Ala Glu Val Arg Lys  
260 265 270  
Asn Met Glu Arg Glu Leu Lys Ser Ala Ile Arg Asn Arg Val Lys Ser  
10 275 280 285  
Gln Ala Ile Glu Gly Leu Val Lys Ala Asn Asp Ile Asp Val Pro Ala  
290 295 300  
Ala Leu Ile Asp Ser Glu Ile Asp Val Leu Arg Arg Gln Ala Ala Gln  
305 310 315 320  
15 Arg Phe Gly Gly Asn Glu Lys Gln Ala Leu Glu Leu Pro Arg Glu Leu  
325 330 335  
Phe Glu Glu Gln Ala Lys Arg Arg Val Val Val Gly Leu Leu Leu Gly  
340 345 350  
Glu Val Ile Arg Thr Asn Glu Leu Lys Ala Asp Glu Glu Arg Val Lys  
20 355 360 365  
Gly Leu Ile Glu Glu Met Ala Ser Ala Tyr Glu Asp Pro Lys Glu Val  
370 375 380  
Ile Glu Phe Tyr Ser Lys Asn Lys Glu Leu Met Asp Asn Met Arg Asn  
385 390 395 400  
25 Val Ala Leu Glu Glu Gln Ala Val Glu Ala Val Leu Ala Lys Ala Lys  
405 410 415  
Val Thr Glu Lys Glu Thr Thr Phe Asn Glu Leu Met Asn Gln Gln Ala  
420 425 430

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 1299

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Escherichia coli

5

&lt;400&gt; 4

atgcaagttt cagttgaaac cactcaaggc cttggccgcc gtgtaacgat tactatcgct 60  
gctgacagca tcgagaccgc tgtaaagaac gagctgggtca acgttgcgaa aaaagtacgt 120  
attgacggct tccgcaaagg caaagtgcc aatgaatctg ttgctcagcg ttatggcgcg 180  
10 tctgtacgcc aggacgttct ggggtgacctg atgagccgta acttcattga cgccatcatt 240  
aaagaaaaaa tcaatccggc tggcgccaccg acttatgttc cgggcgaata caagctgggt 300  
gaagacttca cttactctgt agagtttgaa gtttatccgg aagttgaact gcagggtctg 360  
gaagcgatcg aagttgaaaa accgatcggt gaagtgaccg acgctgacgt tgacggcatg 420  
ctggatactc tgcgtaaaca gcaggcgacc tggaaagaaa aagacggcgc tgttgaagca 480  
15 gaagaccgcg taaccatcga cttcaccggt tctgtagacg gcgaagagtt cgaaggcggt 540  
aaagcgtctg atttcgtact ggcgatgggc cagggtcgta tgatcccggt ctttgaagac 600  
ggtatcaaag gccacaaagc tggcgaagag ttcaccatcg acgtgacctt cccggaagaa 660  
taccacgcag aaaacctgaa aggtaaagca gcgaaattcg ctatcaacct gaagaaagtt 720  
gaagagcgtg aactgccgga actgactgca gaattcatca aacgtttcgg cgttgaagat 780  
20 ggttccgtag aaggtctgcg cgctgaagtg cgtaaaaaca tggagcgcg gctgaagagc 840  
gccatccgta accgcgttaa gtctcaggcg atcgaaggtc tggtaaaagc taacgacatc 900  
gacgtaccgg ctgcgctgat cgacagcgaa atcgacgttc tgcgtcgcca ggctgcacag 960  
cgtttcggtg gcaacgaaaa acaagctctg gaactgccgc gcgaactgtt cgaagaacag 1020  
gctaaacgcc gcgtagttgt tggcctgctg ctgggcgaag ttatccgcac caacgagctg 1080  
25 aaagctgacg aagagcgcg gaaaggcctg atcgaagaga tggcttctgc gtacgaagat 1141  
ccgaaagaag ttatcgagtt ctacagcaaa aacaaagaac tgatggacaa catgcgcaat 1200  
gttgctctgg aagaacaggc tgttgaagct gtactggcga aagcgaaagt gactgaaaaa 1260  
gaaaccactt tcaacgagct gatgaaccag caggcgtaa 1299

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 270

&lt;212&gt; PRT

5 &lt;213&gt; Escherichia coli

&lt;400&gt; 5

Met Lys Ser Leu Phe Lys Val Thr Leu Leu Ala Thr Thr Met Ala Val  
1 5 10 15  
10 Ala Leu His Ala Pro Ile Thr Phe Ala Ala Glu Ala Ala Lys Pro Ala  
20 25 30  
Thr Ala Ala Asp Ser Lys Ala Ala Phe Lys Asn Asp Asp Gln Lys Ser  
35 40 45  
Ala Tyr Ala Leu Gly Ala Ser Leu Gly Arg Tyr Met Glu Asn Ser Leu  
15 50 55 60  
Lys Glu Gln Glu Lys Leu Gly Ile Lys Leu Asp Lys Asp Gln Leu Ile  
65 70 75 80  
Ala Gly Val Gln Asp Ala Phe Ala Asp Lys Ser Lys Leu Ser Asp Gln  
85 90 95  
20 Glu Ile Glu Gln Thr Leu Gln Ala Phe Glu Ala Arg Val Lys Ser Ser  
100 105 110  
Ala Gln Ala Lys Met Glu Lys Asp Ala Ala Asp Asn Glu Ala Lys Gly  
115 120 125  
Lys Glu Tyr Arg Glu Lys Phe Ala Lys Glu Lys Gly Val Lys Thr Ser  
25 130 135 140  
Ser Thr Gly Leu Val Tyr Gln Val Val Glu Ala Gly Lys Gly Glu Ala  
145 150 155 160  
Pro Lys Asp Ser Asp Thr Val Val Val Asn Tyr Lys Gly Thr Leu Ile  
165 170 175

Asp Gly Lys Glu Phe Asp Asn Ser Tyr Thr Arg Gly Glu Pro Leu Ser  
180 185 190  
Phe Arg Leu Asp Gly Val Ile Pro Gly Trp Thr Glu Gly Leu Lys Asn  
195 200 205  
5 Ile Lys Lys Gly Gly Lys Ile Lys Leu Val Ile Pro Pro Glu Leu Ala  
210 215 220  
Tyr Gly Lys Ala Gly Val Pro Gly Ile Pro Pro Asn Ser Thr Leu Val  
225 230 235 240  
Phe Asp Val Glu Leu Leu Asp Val Lys Pro Ala Pro Lys Ala Asp Ala  
10 245 250 255  
Lys Pro Glu Ala Asp Ala Lys Ala Ala Asp Ser Ala Lys Lys  
260 265 270

<210> 6

15 <211> 813

<212> DNA

<213> *Escherichia coli*

<400> 6

20 atgaaatcac tgttttaaagt aacgctgctg gcgaccacaa tggccggtgc cctgcatgca 60  
ccaatcactt ttgctgctga agctgcaaaa cctgctacaa ctgctgacag caaagcagcg 120  
ttcaaaaatg acgatcagaa atcagcttat gcactgggtg cttcgctggg tcgttacatg 180  
gaaaactctc ttaaagaaca agaaaaactg ggcatcaaac tggataaaga tcagctgatc 240  
gctgggtgttc aggatgcatt tgctgataag agcaaaacttt ccgaccaaga gatcgaacag 300  
25 actctgcaag cattcgaagc tcgctggaag tcttctgctc aggccaagat ggaaaaagac 360  
goggctgata acgaagcaaa aggtaaagag taccgcgaga aatttgccaa agagaaaggt 420  
gtgaaaacct cttccactgg tctggtttat caggtagtag aagccggtaa aggccaagcc 480  
ccgaaagaca gcgatactgt tgtagtgaac tacaaaggta cgctgatcga cggtaaagag 540  
ttcgacaact cttacaccgg tggatgaacc ctctctttcc gtctggacgg tgttatcccg 600



ggttggacag aaggtctgaa gaacatcaag aaaggcggta agatcaaact ggttattcca 660  
ccagaactgg cttacggcaa agcgggtgtt ccggggatcc caccgaattc taccctgggtg 720  
tttgacgtag agctgctgga tgtgaaacca gcgccgaagg ctgatgcaaa gccggaagct 780  
gatgcgaaag ccgcagactc tgctaaaaaa taa 813

5

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 428

&lt;212&gt; PRT

10 &lt;213&gt; Escherichia coli

&lt;400&gt; 7

Met Lys Asn Trp Lys Thr Leu Leu Leu Gly Ile Ala Met Ile Ala Asn  
1 5 10 15  
15 Thr Ser Phe Ala Ala Pro Gln Val Val Asp Lys Val Ala Ala Val Val  
20 25 30  
Asn Asn Gly Val Val Leu Glu Ser Asp Val Asp Gly Leu Met Gln Ser  
35 40 45  
Val Lys Leu Asn Ala Ala Gln Ala Arg Gln Gln Leu Pro Asp Asp Ala  
20 50 55 60  
Thr Leu Arg His Gln Ile Met Glu Arg Leu Ile Met Asp Gln Ile Ile  
65 70 75 80  
Leu Gln Met Gly Gln Lys Met Gly Val Lys Ile Ser Asp Glu Gln Leu  
85 90 95  
25 Asp Gln Ala Ile Ala Asn Ile Ala Lys Gln Asn Asn Met Thr Leu Asp  
100 105 110  
Gln Met Arg Ser Arg Leu Ala Tyr Asp Gly Leu Asn Tyr Asn Thr Tyr  
115 120 125  
Arg Asn Gln Ile Arg Lys Glu Met Ile Ile Ser Glu Val Arg Asn Asn

130 135 140  
Glu Val Arg Arg Arg Ile Thr Ile Leu Pro Gln Glu Val Glu Ser Leu  
145 150 155 160  
Ala Gln Gln Val Gly Asn Gln Asn Asp Ala Ser Thr Glu Leu Asn Leu  
5 165 170 175  
Ser His Ile Leu Ile Pro Leu Pro Glu Asn Pro Thr Ser Asp Gln Val  
180 185 190  
Asn Glu Ala Glu Ser Gln Ala Arg Ala Ile Val Asp Gln Ala Arg Asn  
195 200 205  
10 Gly Ala Asp Phe Gly Lys Leu Ala Ile Ala His Ser Ala Asp Gln Gln  
210 215 220  
Ala Leu Asn Gly Gly Gln Met Gly Trp Gly Arg Ile Gln Glu Leu Pro  
225 230 235 240  
Gly Ile Phe Ala Gln Ala Leu Ser Thr Ala Lys Lys Gly Asp Ile Val  
15 245 250 255  
Gly Pro Ile Arg Ser Gly Val Gly Phe His Ile Leu Lys Val Asn Asp  
260 265 270  
Leu Arg Gly Glu Ser Lys Asn Ile Ser Val Thr Glu Val His Ala Arg  
275 280 285  
20 His Ile Leu Leu Lys Pro Ser Pro Ile Met Thr Asp Glu Gln Ala Arg  
290 295 300  
Val Lys Leu Glu Gln Ile Ala Ala Asp Ile Lys Ser Gly Lys Thr Thr  
305 310 315 320  
Phe Ala Ala Ala Ala Lys Glu Phe Ser Gln Asp Pro Gly Ser Ala Asn  
25 325 330 335  
Gln Gly Gly Asp Leu Gly Trp Ala Thr Pro Asp Ile Phe Asp Pro Ala  
340 345 350  
Phe Arg Asp Ala Leu Thr Arg Leu Asn Lys Gly Gln Met Ser Ala Pro  
355 360 365

Val His Ser Ser Phe Gly Trp His Leu Ile Glu Leu Leu Asp Thr Arg  
 370 375 380

Asn Val Asp Lys Thr Asp Ala Ala Gln Lys Asp Arg Ala Tyr Arg Met  
 385 390 395 400

5 Leu Met Asn Arg Lys Phe Ser Glu Glu Ala Ala Ser Trp Met Gln Glu  
 405 410 415

Gln Arg Ala Ser Ala Tyr Val Lys Ile Leu Ser Asn  
 420 425

10

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 1287

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Escherichia coli

15

&lt;400&gt; 8

atgaagaact ggaaaacgct gcttctcggt atcgccatga tcgcgaatac cagtttcgct 60  
 gccccccagg tagtcgataa agtcgcagcc gtcgtcaata acggcgctcg gctggaaagc 120  
 gacgttgatg gattaatgca gtcggtaaaa ctgaacgctg ctcaggcaag gcagcaactt 180  
 20 cctgatgacg cgacgctgcg ccaccaaatac atggaacgtt tgatcatgga tcaaatac 240  
 ctgcagatgg ggcagaaaat gggagtgaat atctccgatg agcagctgga tcaggcgatt 300  
 gctaacatcg cgaaacagaa caacatgacg ctggatcaga tgcgcagccg tctggcttac 360  
 gatggactga actacaacac ctatcgtaac cagatccgca aagagatgat tatctctgaa 420  
 gtgcgtaaca acgaggtgcg tcgtcgcatc accatcctgc cgcaggaagt cgaatccctg 480  
 25 gcgcagcagg tgggtaacca aaacgacgcc agcactgagc tgaacctgag ccacatcctg 540  
 atcccgtgc cggaataccc gacctctgat caggtgaacg aagcggaaag ccaggcgcg 600  
 gccattgtcg atcaggcgcg taacggcgct gatttcggta agctggcgat tgcctattct 660  
 gccgaccagc aggcgctgaa cggcggccag atgggctggg gccgtattca ggagttgccc 720  
 gggatcttcg cccaggcatt aagcaccgcg aagaaaggcg acattgttgg cccgattcgt 780

tccggcgttg gcttccatat tctgaaagtt aacgacctgc gcggcgaaag caaaaatatc 840  
 tcggtgaccg aagttcatgc tcgccatatt ctgctgaaac cgtcgccgat catgactgac 900  
 gaacaggccc gtgtgaaact ggaacagatt gctgctgata tcaagagtgg taaaacgact 960  
 tttgctgccg cagcgaaaga gttctctcag gatccaggct ctgctaacca gggcgggcgat 1020  
 5 ctgggtggg ctacaccaga tattttcgat ccggccttcc gtgacgccct gactcgctg 1080  
 aacaaaggtc aaatgagtgc accggttcac tcttcattcg gctggcattt aatcgaactg 1140  
 ctggataccc gtaatgtcga taaaaccgac gctgcgcaga aagatcgtgc ataccgcatg 1200  
 ctgatgaacc gtaagttctc ggaagaagca gcaagctgga tgcaggaaca acgtgccagc 1260  
 gcctacgtta aaatcctgag caactaa 1287

10

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 459

&lt;212&gt; PRT

15 &lt;213&gt; human

&lt;400&gt; 9

Met	Thr	Ala	Glu	Glu	Met	Lys	Ala	Thr	Glu	Ser	Gly	Ala	Gln	Ser	Ala	
1				5					10					15		
20	Pro	Leu	Pro	Met	Glu	Gly	Val	Asp	Ile	Ser	Pro	Lys	Gln	Asp	Glu	Gly
				20					25					30		
	Val	Leu	Lys	Val	Ile	Lys	Arg	Glu	Gly	Thr	Gly	Thr	Glu	Met	Pro	Met
				35					40					45		
	Ile	Gly	Asp	Arg	Val	Phe	Val	His	Tyr	Thr	Gly	Trp	Leu	Leu	Asp	Gly
25		50						55					60			
	Thr	Lys	Phe	Asp	Ser	Ser	Leu	Asp	Arg	Lys	Asp	Lys	Phe	Ser	Phe	Asp
		65					70					75			80	
	Leu	Gly	Lys	Gly	Glu	Val	Ile	Lys	Ala	Trp	Asp	Ile	Ala	Ile	Ala	Thr
							85					90			95	

Met Lys Val Gly Glu Val Cys His Ile Thr Cys Lys Pro Glu Tyr Ala  
 100 105 110  
 Tyr Gly Ser Ala Gly Ser Pro Pro Lys Ile Pro Pro Asn Ala Thr Leu  
 115 120 125  
 5 Val Phe Glu Val Glu Leu Phe Glu Phe Lys Gly Glu Asp Leu Thr Glu  
 130 135 140  
 Glu Glu Asp Gly Gly Ile Ile Arg Arg Ile Gln Thr Arg Gly Glu Gly  
 145 150 155 160  
 Tyr Ala Lys Pro Asn Glu Gly Ala Ile Val Glu Val Ala Leu Glu Gly  
 10 165 170 175  
 Tyr Tyr Lys Asp Lys Leu Phe Asp Gln Arg Glu Leu Arg Phe Glu Ile  
 180 185 190  
 Gly Glu Gly Glu Asn Leu Asp Leu Pro Tyr Gly Leu Glu Arg Ala Ile  
 195 200 205  
 15 Gln Arg Met Glu Lys Gly Glu His Ser Ile Val Tyr Leu Lys Pro Ser  
 210 215 220  
 Tyr Ala Phe Gly Ser Val Gly Lys Glu Lys Phe Gln Ile Pro Pro Asn  
 225 230 235 240  
 Ala Glu Leu Lys Tyr Glu Leu His Leu Lys Ser Phe Glu Lys Ala Lys  
 20 245 250 255  
 Glu Ser Trp Glu Met Asn Ser Glu Glu Lys Leu Glu Gln Ser Thr Ile  
 260 265 270  
 Val Lys Glu Arg Gly Thr Val Tyr Phe Lys Glu Gly Lys Tyr Lys Gln  
 275 280 285  
 25 Ala Leu Leu Gln Tyr Lys Lys Ile Val Ser Trp Leu Glu Tyr Glu Ser  
 290 295 300  
 Ser Phe Ser Asn Glu Glu Ala Gln Lys Ala Gln Ala Leu Arg Leu Ala  
 305 310 315 320  
 Ser His Leu Asn Leu Ala Met Cys His Leu Lys Leu Gln Ala Phe Ser

325 330 335  
 Ala Ala Ile Glu Ser Cys Asn Lys Ala Leu Glu Leu Asp Ser Asn Asn  
 340 345 350  
 Glu Lys Gly Leu Phe Arg Arg Gly Glu Ala His Leu Ala Val Asn Asp  
 5 355 360 365  
 Phe Glu Leu Ala Arg Ala Asp Phe Gln Lys Val Leu Gln Leu Tyr Pro  
 370 375 380  
 Asn Asn Lys Ala Ala Lys Thr Gln Leu Ala Val Cys Gln Gln Arg Ile  
 385 390 395 400  
 10 Arg Arg Gln Leu Ala Arg Glu Lys Lys Leu Tyr Ala Asn Met Phe Glu  
 405 410 415  
 Arg Leu Ala Glu Glu Glu Asn Lys Ala Lys Ala Glu Ala Ser Ser Gly  
 420 425 430  
 Asp His Pro Thr Asp Thr Glu Met Lys Glu Glu Gln Lys Ser Asn Thr  
 15 435 440 445  
 Ala Gly Ser Gln Ser Gln Val Glu Thr Glu Ala  
 450 455

20 <210> 10

<211> 1380

<212> DNA

<213> human

25 <400> 10

atgacagccg aggagatgaa ggcgaccgag agcggggcgcc agtcggcgcc gctgcccattg 60  
 gagggagtgg acatcagccc caaacaggac gaaggcgtgc tgaaggtcat caagagagag 120  
 ggcacaggta cagagatgcc catgattggg gaccgagtct ttgtccacta cactggctgg 180  
 ctattagatg gcacaaagtt tgactccagt ctggatcgca aggacaaatt ctcctttgac 240

ctgggaaaag gggaggtcat caaggcttgg gacattgcca tagccaccat gaaggtgggg 300  
 gaggtgtgcc acatcacctg caaaccagaa tatgcctacg gttcagcagg cagtcctcca 360  
 aagattcccc ccaatgccac gcttgtatit gaggtggagt tgittgagtt taaggagaa 420  
 gatctgacgg aagaggaaga tggcggaatc attcgagaa tacagactcg cggatgaaggc 480  
 5 tatgctaagc ccaatgaggg tgctatcgtg gaggttgac tggaagggtta ctacaaggac 540  
 aagctctttg accagcggga gctccgcttt gagattggcg agggggagaa cctggatctg 600  
 ccttatggtc tggagagggc cattcagcgc atggagaaag gagaacattc catcgtgtac 660  
 ctcaagccca gctatgcttt tggcagtgtt gggaaggaaa agttccaaat cccaccaaat 720  
 gctgagctga aatatgaatt acacctcaag agttttgaaa aggccaagga gtcttgggag 780  
 10 atgaattcag aagagaagct ggaacagagc accatagtga aagagcgggg cactgtgtac 840  
 ttcaaggaag gtaaatacaa gcaagcttta ctacagtata agaagatcgt gtcttggctg 900  
 gaatatgagt ctagtitttc caatgaggaa gcacagaaag cacaggccct tcgactggcc 960  
 tctcacctca acctggccat gtgtcatctg aaactacagg ctttctctgc tgccattgaa 1020  
 agctgtaaca aggccttaga actggacagc aacaacgaga agggcctctt ccgcccggga 1080  
 15 gaggccacc tggccgtgaa tgactttgaa ctggcacggg ctgatttcca gaaggtcctg 1140  
 cagctctacc ccaacaacaa agccgccaag acccagctgg ctgtgtgcca gcagcggatc 1200  
 cgaaggcagc ttgcccggga gaagaagctc tatgccaata tgtttgagag gctggctgag 1260  
 gaggagaaca aggccaaggc agaggcttcc tcaggagacc atccactga cacagagatg 1320  
 aaggaggagc agaagagcaa cacggcaggg agccagtctc aggtggagac agaagcatag 1380

20

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 370

&lt;212&gt; PRT

25 &lt;213&gt; human

&lt;400&gt; 11

Met Ser His Pro Ser Pro Gln Ala Lys Pro Ser Asn Pro Ser Asn Pro

1

5

10

15

Arg Val Phe Phe Asp Val Asp Ile Gly Gly Glu Arg Val Gly Arg Ile  
 20 25 30  
 Val Leu Glu Leu Phe Ala Asp Ile Val Pro Lys Thr Ala Glu Asn Phe  
 35 40 45  
 5 Arg Ala Leu Cys Thr Gly Glu Lys Gly Ile Gly His Thr Thr Gly Lys  
 50 55 60  
 Pro Leu His Phe Lys Gly Cys Pro Phe His Arg Ile Ile Lys Lys Phe  
 65 70 75 80  
 Met Ile Gln Gly Gly Asp Phe Ser Asn Gln Asn Gly Thr Gly Gly Glu  
 10 85 90 95  
 Ser Ile Tyr Gly Glu Lys Phe Glu Asp Glu Asn Phe His Tyr Lys His  
 100 105 110  
 Asp Arg Glu Gly Leu Leu Ser Met Ala Asn Ala Gly Arg Asn Thr Asn  
 115 120 125  
 15 Gly Ser Gln Phe Phe Ile Thr Thr Val Pro Thr Pro His Leu Asp Gly  
 130 135 140  
 Lys His Val Val Phe Gly Gln Val Ile Lys Gly Ile Gly Val Ala Arg  
 145 150 155 160  
 Ile Leu Glu Asn Val Glu Val Lys Gly Glu Lys Pro Ala Lys Leu Cys  
 20 165 170 175  
 Val Ile Ala Glu Cys Gly Glu Leu Lys Glu Gly Asp Asp Gly Gly Ile  
 180 185 190  
 Phe Pro Lys Asp Gly Ser Gly Asp Ser His Pro Asp Phe Pro Glu Asp  
 195 200 205  
 25 Ala Asp Ile Asp Leu Lys Asp Val Asp Lys Ile Leu Leu Ile Thr Glu  
 210 215 220  
 Asp Leu Lys Asn Ile Gly Asn Thr Phe Phe Lys Ser Gln Asn Trp Glu  
 225 230 235 240  
 Met Ala Ile Lys Lys Tyr Ala Glu Val Leu Arg Tyr Val Asp Ser Ser



245 250 255  
 Lys Ala Val Ile Glu Thr Ala Asp Arg Ala Lys Leu Gln Pro Ile Ala  
 260 265 270  
 Leu Ser Cys Val Leu Asn Ile Gly Ala Cys Lys Leu Lys Met Ser Asn  
 5 275 280 285  
 Trp Gln Gly Ala Ile Asp Ser Cys Leu Glu Ala Leu Glu Leu Asp Pro  
 290 295 300  
 Ser Asn Thr Lys Ala Leu Tyr Arg Arg Ala Gln Gly Trp Gln Gly Leu  
 305 310 315 320  
 10 Lys Glu Tyr Asp Gln Ala Leu Ala Asp Leu Lys Lys Ala Gln Gly Ile  
 325 330 335  
 Ala Pro Glu Asp Lys Ala Ile Gln Ala Glu Leu Leu Lys Val Lys Gln  
 340 345 350  
 Lys Ile Lys Ala Gln Lys Asp Lys Glu Lys Ala Val Tyr Ala Lys Met  
 15 355 360 365  
 Phe Ala  
 370

20 <210> 12

<211> 1113

<212> DNA

<213> human

25 <400> 12

atgtcgcacc cgtcccccca agccaagccc tccaacccca gtaaccctcg agtcttcttt 60  
 gacgtggaca tcggagggga gcgagttggt cgaattgtct tagaattggt tgcagatata 120  
 gtacccaaaa ctgcggaaaa ttttcgtgca ctgtgtacag gagaaaaagg cattggacac 180  
 acgactggga aacctctcca tttcaaagga tgcccttttc atcgaattat taagaaattt 240

atgattcagg gtggagactt ctcaaatcag aatgggacag gtggagaaag tatttatggt 300  
 gaaaaatttg aagatgaaaa tttccattac aagcatgac gggagggttt actgagcatg 360  
 gcaaatgcag gccgcaacac aaacggttct cagtttttta tcacaacagt tccaactcct 420  
 catttgatg ggaaacatgt ggtgtttggc caagtaatta aaggaatagg agtggcaagg 480  
 5 atattggaaa atgtggaagt gaaaggtgaa aaacctgcta aattgtgcgt tattgcagaa 540  
 tgtggagaat tgaaggaagg agatgacggg ggaatattcc caaaagatgg ctctggcgac 600  
 agtcatccag atttccctga ggatgcggat atagatttaa aagatgtaga taaaatttta 660  
 ttaataacag aagacttaaa aaacatttga aatacttttt tcaaattcca gaactgggag 420  
 atggctatta aaaaatatgc agaagtttta agatacgtgg acagttcaaa ggctgttatt 780  
 10 gagacagcag atagagccaa gctgcaacct atagctttta gctgtgtact gaatattggt 840  
 gcttgtaaac tgaagatgtc aaattggcag ggagcaattg acagttgttt agaggctctt 900  
 gaactagacc catcaaatac caaagcattg taccgcagag ctcaaggatg gcaaggatta 960  
 aaagaatatg atcaagcatt ggctgatctt aagaaagctc aggggatagc accagaagat 1020  
 aaagctatcc aggcagaatt gctgaaagtc aaacaaaaga taaaggcaca gaaagataaa 1080  
 15 gagaaggcag tatatgcaaa aatgtttgct tag 1113

<210> 13

<211> 422

20 <212> PRT

<213> human

<400> 13

Met	Asp	Val	Leu	Ser	Pro	Gly	Gln	Gly	Asn	Asn	Thr	Thr	Ser	Pro	Pro
25				5					10					15	
	Ala	Pro	Phe	Glu	Thr	Gly	Gly	Asn	Thr	Thr	Gly	Ile	Ser	Asp	Val
				20					25					30	
	Val	Ser	Tyr	Gln	Val	Ile	Thr	Ser	Leu	Leu	Leu	Gly	Thr	Leu	Ile
				35					40					45	

Cys Ala Val Leu Gly Asn Ala Cys Val Val Ala Ala Ile Ala Leu Glu  
50 55 60  
Arg Ser Leu Gln Asn Val Ala Asn Tyr Leu Ile Gly Ser Ler Ala Val  
65 70 75 80  
5 Thr Asp Leu Met Val Ser Val Leu Val Leu Pro Met Ala Ala Leu Tyr  
85 90 95  
Gln Val Leu Asn Lys Trp Thr Leu Gly Gln Val Thr Cys Asp Leu Phe  
100 105 110  
Ile Ala Leu Asp Val Leu Cys Cys Thr Ser Ser Ile Leu His Leu Cys  
10 115 120 125  
Ala Ile Ala Leu Asp Arg Tyr Trp Ala Ile Thr Asp Pro Ile Asp Tyr  
130 135 140  
Val Asn Lys Arg Thr Pro Arg Arg Ala Ala Ala Leu Ile Ser Leu Thr  
145 150 155 160  
15 Trp Leu Ile Gly Phe Leu Ile Ser Ile Pro Pro Met Leu Gly Trp Arg  
165 170 175  
Thr Pro Glu Asp Arg Ser Asp Pro Asp Ala Cys Thr Ile Ser Lys Asp  
180 185 190  
His Gly Tyr Thr Ile Tyr Ser Thr Phe Gly Ala Phe Tyr Ile Pro Leu  
20 195 200 205  
Leu Leu Met Leu Val Leu Tyr Gly Arg Ile Phe Arg Ala Ala Arg Phe  
210 215 220  
Arg Ile Arg Lys Thr Val Lys Lys Val Glu Lys Thr Gly Ala Asp Thr  
225 230 235 240  
25 Arg His Gly Ala Ser Pro Ala Pro Gln Pro Lys Lys Ser Val Asn Gly  
245 250 255  
Glu Ser Gly Ser Arg Asn Trp Arg Leu Gly Val Glu Ser Lys Ala Gly  
260 265 270  
Gly Ala Leu Cys Ala Asn Gly Ala Val Arg Gln Gly Asp Asp Gly Ala

275                                      280                                      285  
 Ala Leu Glu Val Ile Glu Val His Arg Val Gly Asn Ser Lys Glu His  
 290                                      295                                      300  
 Leu Pro Leu Pro Ser Glu Ala Gly Pro Thr Pro Cys Ala Pro Ala Ser  
 5 305                                      310                                      315                                      320  
 Phe Glu Arg Lys Asn Glu Arg Asn Ala Glu Ala Lys Arg Lys Met Ala  
 325                                      330                                      335  
 Leu Ala Arg Glu Arg Lys Thr Val Lys Thr Leu Gly Ile Ile Met Gly  
 340                                      345                                      350  
 10 Thr Phe Ile Ler Cys Trp Leu Pro Phe Phe Ile Val Ala Leu Val Leu  
 355                                      360                                      365  
 Pro Phe Cys Glu Ser Ser Cys His Met Pro Thr Leu Leu Gly Ala Ile  
 370                                      375                                      380  
 Ile Asn Trp Leu Gly Tyr Ser Asn Ser Leu Leu Asn Pro Val Ile Tyr  
 15 385                                      390                                      395                                      400  
 Ala Tyr Phe Asn Lys Asp Phe Gln Asn Ala Phe Lys Lys Ile Ile Lys  
 405                                      410                                      415  
 Cys Lys Phe Cys Arg Gln  
 420

20

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 1266

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; human

25

&lt;400&gt; 14

atggatgtgc tcagccctgg tcagggcaac aacaccacat caccaccggc tccctttgag 60  
 accggcggca acactactgg tatctccgac gtgaccgtca gctaccaagt gatcacctct 120  
 ctgctgctgg gcacgctcat cttctgcgcg gtgctgggca atgcgtgcgt ggtggctgcc 180

atcgcccttgg agcgctccct gcagaacgtg gccaaattatc ttattggctc tttggcggtc 240  
accgacctca tgggtgtcggg gttgggtgctg cccatggccg cgctgtatca ggtgctcaac 300  
aagtggacac tgggccaggt aacctgacac ctgttcacgc ccctcgacgt gctgtgctgc 360  
acctcatcca tcttgcacct gtgcgccatc gcgctggaca ggtactgggc catcacggac 420  
5 cccatcgact acgtgaacaa gaggacgccc cggcgcgcgc ctgcgctcat ctcgctcact 480  
tggettattg gcttcctcat ctctatcccg cccatgctgg gctggcgcac cccggaagac 540  
cgctcggacc ccgacgatg caccattagc aaggatcatg gctacactat ctattccacc 600  
tttggagctt tctacatccc gctgctgctc atgctggttc tctatgggcg catattccga 660  
gctgcgcgct tccgcatccg caagacggtc aaaaagggtg agaagaccgg agcggacacc 720  
10 cgccatggag catctcccgc ccgcagccc aagaagagtg tgaatggaga gtcggggagc 780  
aggaactgga ggctgggcgt ggagagcaag gctgggggtg ctctgtgcgc caatggcgcg 840  
gtgaggcaag gtgacgatgg cgccgccctg gaggtgatcg aggtgcaccg agtgggcaac 900  
tccaaagagc acttgcctct gccagcgag gctggtccta ccccttgtgc cccgcctct 960  
ttcgagagga aaaatgagcg caacgccgag gcgaagcgca agatggccct ggcccagag 1020  
15 aggaagacag tgaagacgct gggcatcatc atgggcacct tcatcctctg ctggctgccc 1080  
ttcttcacgc tggctcttgt tctgcccttc tgcgagagca gctgccacat gccaccctg 1140  
ttgggcgcca taatcaattg gctgggctac tccaactctc tgcttaacct cgtcatttac 1200  
gcatacttca acaaggactt tcaaaacgcg tttaagaaga tcattaagtg taagttctgc 1260  
cgccag 1266

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
JP03/08020

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C07K16/42, C07K19/00, C12N1/21, C12P21/02,  
C12N9/90 // (C12N1/21, C12R1:19), (C12P21/02, C12R1:19)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C07K16/42, C07K19/00, C12N1/21, C12P21/02,  
C12N9/90

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
MEDLINE (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	WO 00/075346 A1 (Medical Research Council), 14 December, 2000 (14.12.00), & JP 2003-501064 A	1-4, 22-30, 32 /5-21, 31
Y	Ideno A. et al., The 28.3 kDa FK506 binding protein from a thermophilic archaeum, Methanobacterium thermoautotrophicum, protects the denaturation of proteins in vitro, Eur.J. Biochem., 2000, Vol.267(11), pages 3139 to 3149	5, 6, 9-11, 31
Y	Behrens S. et al., The SurA periplasmic PPIase lacking its parvulin domains functions in vivo and has chaperone activity, EMBO J., 2001, Vol.20(1-2), pages 285 to 294	5, 8, 31

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not  
considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing  
date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is  
cited to establish the publication date of another citation or other  
special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other  
means

"P" document published prior to the international filing date but later  
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or  
priority date and not in conflict with the application but cited to  
understand the principle or theory underlying the invention  
document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered novel or cannot be considered to involve an inventive  
step when the document is taken alone  
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered to involve an inventive step when the document is  
combined with one or more other such documents, such  
combination being obvious to a person skilled in the art  
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered to involve an inventive step when the document is  
combined with one or more other such documents, such  
combination being obvious to a person skilled in the art  
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
15 October, 2003 (15.10.03)

Date of mailing of the international search report  
28 October, 2003 (28.10.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

JP03/08020

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MARUYAMA T. et al., Archaeal peptidyl prolyl cis-trans isomerases (PPIases), Front Biosci., 2000, Vol.5, p.D821-836	5,6,9,10,31
Y	Huang GC. et al., Assisted folding of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by trigger factor, Protein Sci., 2000, Vol.9(6), pages 1254 to 1261	5,6,12,31
Y	Zarnt T. et al., Modular structure of the trigger factor required for high activity in protein folding, J.Mol.Biol., 1997, Vol.271(5), pages 827 to 837	5-8,13,31
Y	Arie JP. et al., Chaperone function of FkpA, a heat shock prolyl isomerase, in the periplasm of Escherichia coli, Mol.Microbiol., 2001, Vol.39(1), pages 199 to 210	5-8,14,15,31
Y	Ratajczak T. et al., The cyclophilin component of the unactivated estrogen receptor contains a tetratricopeptide repeat domain and shares identity with p59 (FKBP59), J.Biol.Chem., 1993, Vol.268(18), pages 13187 to 13192	5-8,16,17,31
Y	Pirk1 F. et al., Functional analysis of the Hsp90-associated human peptidyl prolyl cis/trans isomerases FKBP51, FKBP52 and Cyp40, J.Mol.Biol., 2001, Vol.308(4), pages 795 to 806	5-8,18,19,31
Y	Ramm K. et al., The periplasmic Escherichia coli peptidylprolylcis, trans-isomerase FkpA. II. Isomerase-independent chaperone activity in vitro, J.Biol.Chem., 2000, Vol.275(22), pages 17106 to 17113	5-8,14,15,20,21,31
P,X	JP 2002-306182 A (Toyota Central Research And Development Laboratories, Inc.), 22 October, 2002 (22.10.02), (Family: none)	1-32
P,X	JP 2002-262883 A (Sekisui Chemical Co., Ltd.), 17 September, 2002 (17.09.02), (Family: none)	1-32

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl <sup>7</sup> C12N15/09, C07K16/42, C07K19/00, C12N1/21, C12P21/02, C12N9/90 // (C12N1/21, C12R1:19), (C12P21/02, C12R1:19)		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl <sup>7</sup> C12N15/09, C07K16/42, C07K19/00, C12N1/21, C12P21/02, C12N9/90		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) MEDLINE (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y	WO 00/075346 A1 (メディカル リサーチ カウンシル) 2000. 12. 14 & JP 2003-501064 A	1-4, 22-30, 32 /5-21, 31
Y	Ideno A et al, The 28.3 kDa FK506 binding protein from a thermophilic archaeum, Methanobacterium thermoautotrophicum, protects the denaturation of proteins in vitro, Eur J Biochem, 2000, vol. 267 (11), p. 3139-3149	5, 6, 9-11, 31
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 15. 10. 03	国際調査報告の発送日 28. 10. 03	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 光本 美奈子 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Behrens S et al, The SurA periplasmic PPIase lacking its parvulin domains functions in vivo and has chaperone activity, EMBO J, 2001, vol. 20(1-2), p. 285-294	5, 8, 31
Y	Maruyama T et al, Archaeal peptidyl prolyl cis-trans isomerases (PPIases), Front Biosci, 2000, vol. 5, p. D821-836	5, 6, 9, 10, 31
Y	Huang GC et al, Assisted folding of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by trigger factor, Protein Sci, 2000, vol. 9(6), p. 1254-1261	5, 6, 12, 31
Y	Zarnt T et al, Modular structure of the trigger factor required for high activity in protein folding, J Mol Biol, 1997, vol. 271(5), p. 827-837	5-8, 13, 31
Y	Arie JP et al, Chaperone function of FkpA, a heat shock prolyl isomerase, in the periplasm of Escherichia coli, Mol Microbiol, 2001, vol. 39(1), p. 199-210	5-8, 14, 15, 31
Y	Ratajczak T et al, The cyclophilin component of the unactivated estrogen receptor contains a tetratricopeptide repeat domain and shares identity with p59 (FKBP59), J Biol Chem, 1993, vol. 268(18), p. 13187-13192	5-8, 16, 17, 31
Y	Pirkel F et al, Functional analysis of the Hsp90-associated human peptidyl prolyl cis/trans isomerases FKBP51, FKBP52 and Cyp40, J Mol Biol, 2001, vol. 308(4), p. 795-806	5-8, 18, 19, 31
Y	Ramm K et al, The periplasmic Escherichia coli peptidylprolyl cis,trans-isomerase FkpA. II. Isomerase-independent chaperone activity in vitro, J Biol Chem, 2000, vol. 275(22), p. 17106-17113	5-8, 14, 15, 20, 21, 31
PX	JP 2002-306182 A(株式会社豊田中央研究所) 2002. 10. 22 ファミリーなし	1-32
PX	JP 2002-262883 A(積水化学工業株式会社) 2002. 9. 17 ファミリーなし	1-32

BEST AVAILABLE COPY